

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局



(43) 国際公開日  
2003年5月15日 (15.05.2003)

PCT

(10) 国際公開番号  
WO 03/040363 A1

- (51) 国際特許分類: C12N 15/09, (KIKUCHI, Kazuhiro) [JP/JP]; 〒444-0811 愛知県岡崎市 大西町字仁田29-1-201 Aichi (JP). 平野 博之 (HIRANO, Hiroyuki) [JP/JP]; 〒120-0012 東京都足立区 青井2-16-4-312 Tokyo (JP). 和田 正三 (WADA, Masamitsu) [JP/JP]; 〒156-0057 東京都世田谷区 上北沢3-25-7 Tokyo (JP).
- (21) 国際出願番号: PCT/JP02/11585
- (22) 国際出願日: 2002年11月6日 (06.11.2002)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (74) 代理人: 下田 昭, 外 (SHIMODA, Akira et al.); 〒160-0021 東京都新宿区 歌舞伎町2-41-12 岡塾ビル7階 Tokyo (JP).
- (30) 優先権データ:  
特願2001-343002 2001年11月8日 (08.11.2001) JP  
特願2002-9729 2002年1月18日 (18.01.2002) JP  
特願2002-167345 2002年6月7日 (07.06.2002) JP  
特願2002-234412 2002年8月12日 (12.08.2002) JP
- (81) 指定国 (国内): CN, JP, KR, PH, US.
- (84) 指定国 (広域): ヨーロッパ特許 (CH, ES, FR, GR, IT, NL).
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 科学技術振興事業団 (JAPAN SCIENCE AND TECHNOLOGY CORPORATION) [JP/JP]; 〒332-0012 埼玉県川口市本町4-1-8 Saitama (JP).
- 添付公開書類:  
— 国際調査報告書
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 菊池 一浩
- 2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: RICE TRANSPOSON GENES

(54) 発明の名称: イネのトランスポゾン遺伝子

(57) Abstract: A non-independent transposon gene, an independent transposon gene and a transposes gene of rice; a method of transferring such a transposon gene and plants transformed by the transfer. As the results of studies on rice genome base sequences, a non-independent transposon gene, an independent transposon gene and a transposes gene of rice are found out. In rice varieties having these genes transferred thereto, it is confirmed that transposon has been transferred.

(57) 要約:

この発明は、イネの非自立的トランスポゾン遺伝子、自立的トランスポゾン遺伝子及びトランスポゼース遺伝子、並びにトランスポゾン遺伝子を転移させる方法及びこの転移により形質転換した植物に関する。

発明者は、イネゲノム塩基配列を調べた結果、イネの非自立的トランスポゾン遺伝子、自立的トランスポゾン遺伝子及びトランスポゼース遺伝子を見出し、これらの遺伝子を導入したイネ品種においてトランスポゾンの転移を確認した。

WO 03/040363 A1

## 明 細 書

## イネのトランスポゾン遺伝子

5 技術分野

この発明は、イネの非自立的トランスポゾン遺伝子、自立的トランスポゾン遺伝子及びトランスポゼース遺伝子、並びにトランスポゾン遺伝子を転移させる方法及びこの転移により形質転換した植物に関する。

10 従来技術

イネ (*Oryza sativa*) のゲノムの機能解析の一手段として遺伝子破壊法が用いられている。イネの遺伝子破壊には、アクチベーター因子のトランスポゼース (転移酵素) 遺伝子を導入した固体と分離因子を導入した固体とを交配させて、  
15 分離因子を活性化させる方法、T-DNAを用いる方法、レトロトランスポゾンによる方法等が知られているが、イネの自然突然変異体を解析しても、活性のあるトランスポゾンの存在は知られていなかった (細胞工学別冊 植物細胞工学シリーズ 14 「植物のゲノム研究プロトコル」 2000 年 2 月 (秀潤社))。

一方、ゲノムプロジェクトによりイネをはじめとして多くの植物の遺伝子の塩基配列が明らかにされつつあり、それらの結果は逐次データベース化されている。  
20 さらに動植物における動く遺伝子としてトランスポゾン遺伝子はある程度特有の塩基配列を有しているため、その情報を基にトランスポゾンの可能性を有する遺伝子の研究がなされているが、未だに十分な解明がなされていない。

なお、イネをγ線照射することにより誘発された突然変異体からトランスポゾンと考えられる配列が見出されている (中崎鉄也ら「易変性細粒遺伝子 s l g 座  
25 領域におけるトランスポゾン様配列の挿入多型性」、日本育種学会第 100 回秋季大会、2001 年 10 月)。

発明が解決しようとする課題

発明者は、イネゲノム塩基配列を調べていたところ、トランスポゾンに特徴的

な逆向き反復配列を発見し、トランスポゾンと目される配列に関し幾多の試験を行ったところ、これがトランスポゾン（非自立的トランスポゾン）であることの確証を得た。

- 更に、本発明者は、この非自立的トランスポゾン遺伝子を基に、自立的トランスポゾン遺伝子を見出し、更に、その遺伝子を転移させるトランスポゼース遺伝子を特定した。

#### 課題を解決するための手段

- 発明者は、順次データベースに登録されるイネゲノム塩基配列をもとに、1番染色体より、反復配列（LTR）を調べていた。表1に示すアクセッションナンバーAP002843のクローンにおいて、LTRに注目し、この領域について、詳細に解析していたところ、LTRの直後の144459-144473及び144874-144888の場所に、トランスポゾンに特徴的な逆向き反復配列を発見した（第1図、配列番号6）。後述の実施例にて明らかにされるが、この反復配列に挟まれた配列（配列番号1）は、蕨培養等の人為的操作により顕著に可動性を示す非自立的トランスポゾンであることがわかった。

表 1

AP002843 *Oryza sativa* genomic DNA, chromosome 1, PA

|           |   |           |             |
|-----------|---|-----------|-------------|
| ACCESSION | AP002843  | NCBI SRS  | Genome-Net  |
| ORGANISM  | <i>Oryza sativa</i>   | NCBI SRS  |             |
| LOCUS     | AP002843  | 148762 bp | DNA         |
|           |   | PLN       | 26-JAN-2001 |
| FEATURES  | Location/Qualifiers   |           |             |
| source    | 1..148762   |           |             |
|           | /chromosome="1"   |           |             |
|           | /clone="P0407B12"   |           |             |
|           | /cultivar="Nipponbare"                                      |           |             |
|           | /organism="Oryza sativa"                                    |           |             |
|           | /sequenced_mol="DNA"  |           |             |
| LTR       | 139482..139690  |           |             |
|           | /note="5' LTR"  |           |             |
| CDS       | 139739..144052  |           |             |
|           | /gene="P0407B12.28"   |           |             |
|           | /note="probably inactive due to frameshifts in CDS"         |           |             |
|           | /note="pseudogene, similar to <i>Oryza longistaminata</i> " |           |             |
|           | probable gag/pol polyprotein U72725"                        |           |             |
|           | /pseudo   |           |             |
| LTR       | 144047..144255  |           |             |
|           | /note="3' LTR"  |           |             |
| CDS       | join(144653..144692,145148..145311)                         |           |             |
|           | /codon_start=1  |           |             |
|           | /gene="P0407B12.29"   |           |             |
|           | /note="hypothetical protein"                                |           |             |
|           | /protein_id="BAE17191.1"                                    |           |             |
|           | /translation="MRRSHGGGGRKRSVPSSSHPEKKAIDRIKREDAGKRGRVSLMQ   |           |             |
|           | PLAAFPATDGGGGGLARLLRW"                                      |           |             |

次に、この非自立的トランスポゾン（配列番号1）を Query（ホモロジー探索用DNA）として用いて BLAST 法によりホモロジー検索を行った。検索結果の多くは、この非自立的トランスポゾン（配列番号1）そのものであったが、その他にトランスポゾンと期待されるアクセッションナンバー AP004236 と AP003968 が見出された。これら AP004236 と AP003968 とを比較したところ、共に第6染色体上のクローンであり、重複した同じ領域の配列であった。

そのため、非自立的トランスポゾン（配列番号1）の 1-253 と AP004236 の 89360-89612 の間では、相同性は 252/253 (99%) であり、非自立的トランスポゾン（配列番号1）の 254-430 と AP004236 の 94524-94700 の間では、相同性は 177/177 (100%) と保存されていた。

この非自立的トランスポゾン（配列番号1、430bp）とこのトランスポゾン（配列番号2、5341bp）は、共に、15bp の逆向き反復配列を有し、TTA又はTAAを認識して挿入されている。

配列番号 2 (5341bp) の配列をもとに Open Reading Frame (ORF) を探したところ、2 種類の推測される ORF I と ORF II が検索された。

配列番号 2 で表される塩基配列を有するトランスポゾン遺伝子の構造を第 9 図上に示す。非自立的トランスポゾン (配列番号 1、430bp) は、1-253 及び  
5 5165-5341、ORF I は 1526-1914 及び 1939-2663、ORF II は 3190-4557 にそれぞれ位置していた。

更に、配列番号 2 で表される塩基配列と類似した遺伝子を単離するために配列番号 2 を Query (ホモロジー検索用 DNA) として BLAST 法によりホモロジー検索をしたところ、配列番号 2 で表される塩基配列以外にアクセッションナンバー  
10 AP004753 (第 2 染色体) と AP003714 (第 6 染色体) が見い出された。この 2 種類のクローンは同じ配列 (配列番号 3) であり、異なる染色体に座していた (数コピー存在)。インディカ型にも存在することから、日本型からインディカ型まで、多くの品種に保持されている遺伝子である。この配列番号 3 (5166bp) で表される塩基配列は、配列番号 2 で表される塩基配列と同じように、逆向き反復を有し、TAA (3bp) を認識して挿入されていた。  
15

配列番号 3 の配列をもとに Open Reading Frame (ORF) を探したところ、ORF I と ORF II が検索され 2 種類のタンパク質をコードしていると考えられた。

配列番号 3 で表される塩基配列を有するトランスポゾン遺伝子の構造を第 9 図下に示す。非自立的トランスポゾン (配列番号 1、430bp) は、1-170 及び  
20 5092-5166 に位置しているが、非自立的トランスポゾン (配列番号 1、430bp) との一致が途中からなくなっている。また ORF I は 1630-2652、ORF II は 2959-4407 にそれぞれ位置していた。

配列番号 3 で表される塩基配列をジャポニカ (AP004753 及び AP003714) とインディカ (Scaffold6962) で比較してみると、第 10 図で示すように、90%  
25 以上の相同性が確認された。なお、非自立的トランスポゾン (配列番号 1、430bp) のインディカにおける変異頻度を調べてみると、第 11 図で示すように、95% 以上の相同性が確認された。

配列番号 2 及び 3 の ORF I は、いまのところ機能の類推には至っていない。

次に、ORF II がトランスポゼース (転移酵素) をコードしているか否かを明

らかにするため、ORF II のアミノ酸配列について、既知のトランスポゼースの保存領域の有無を調べた。配列番号2のORF II と配列番号3のORF II のアミノ酸配列を配列番号4と配列番号5に示す。これら2つのORF II のアミノ酸配列の比較を第12図に示すが、それらの間の相同性は75%以上(77%)と非常

5 常に高かった。これら2種のアミノ酸配列は、共に DXG/AF/F motif と YREK motif を有するため (Q. H. Le, K. Turcotte and T. Bureau, Genetics 158: 1081-1088 (2001))、IS transposase family に属すると結論される。

また、配列番号2のORF II の塩基配列と、配列番号3のORF II の塩基配列

10 との相同性は75%以上(79.3%)であった。

即ち、本発明は、配列番号1で表される塩基配列に少なくとも95%相同のDNAから成るイネのトランスポゾン遺伝子である。配列番号1で表される塩基配列に少なくとも95%相同のDNAは、薬培養又は薬剤で処理することにより転

15 移する非自立的トランスポゾンとしての機能を有する遺伝子であると考えられる。

また、本発明は、エンハンサー又はプロモーターがその内部に挿入された請求項1に記載のトランスポゾン遺伝子である。

更に、本発明は、配列番号2又は配列番号3で表される塩基配列に少なくとも90%相同のDNAから成るイネのトランスポゾン遺伝子である。配列番号2又は配列番号3で表される塩基配列に少なくとも90%相同のDNAは、薬培養又は薬剤で処理することにより転移する自立的トランスポゾンとしての機能を有する

20 遺伝子であると考えられる。

また、本発明は、配列番号2の3190位～4557位の塩基配列又は配列番号3の2959位～4407位の塩基配列に少なくとも75%相同のDNAから成るイネのトランスポゼース遺伝子である。これらの塩基配列に少なくとも75%相同のDNAは、上記のトランスポゾン遺伝子を転移させる機能を有する

25 遺伝子であると考えられる。

また、本発明は、配列番号4若しくは配列番号5で表されるアミノ酸配列、又はこのアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付

加されたアミノ酸配列を有するタンパク質から成るトランスポゼースである。また、このトランスポゼースは、配列番号4又は配列番号5で表されるアミノ酸配列に少なくとも75%相同のアミノ酸配列を有するイネのトランスポゾン遺伝子であるといえる。

5 更に、本発明は、このタンパク質をコードするトランスポゼース遺伝子である。

本発明は、また、上記に記載のいずれかのトランスポゾン遺伝子を含有するプラスミドである。更に、本発明は、プロモーター及び上記に記載のいずれかのトランスポゼース遺伝子を含有するプラスミドである。ここで用いることのできるプラスミドとして、Tiプラスミド、pBI-121プラスミド等のバイナリーベクターが挙げられる。ここで用いることのできるプロモーターとしては、カリフラワーモザイクウィルスの35Sプロモーター・熱ショックプロモーター・化学物質誘導性プロモーター等が挙げられる。またプロモーター及び上記遺伝子の結合方法に特に制限は無く、通常の遺伝子工学的手法に従って適宜行えばよい。

10

また、本発明は、上記のいずれかのトランスポゾン遺伝子が導入された形質転換体である。この宿主は植物であることが好ましく、宿主としては、イネ、オオムギ、コムギ又はトウモロコシが好ましい。このような植物を形質転換するには、通常の遺伝子工学的手法を用いて、この遺伝子を上記プラスミドに挿入し、この植物を形質転換すればよい。

15

更に、本発明は、プロモーター及び上記トランスポゼース遺伝子が導入された形質転換体である。これらの他に必要に応じてトランスポゾン遺伝子を導入してもよい。プロモーターとしては上記のものを用いることができる。この宿主は植物であることが好ましく、宿主としては、オオムギ、コムギ又はトウモロコシが好ましい。このような植物を形質転換するには、通常の遺伝子工学的手法を用いて、この遺伝子を上記プラスミドに挿入し、この植物を形質転換すればよい。

20

本発明はまた、上記のいずれかの形質転換体を薬培養又は薬剤で処理することにより、上記のいずれかのトランスポゾン遺伝子を転移させる方法である。

25

更に、本発明は、上記のいずれかの方法により、前記トランスポゾン遺伝子が転移して形質転換した植物又はその種である。この植物としてイネ、又はイネの近隣種であるオオムギ、コムギ若しくはトウモロコシが好ましい。

また本発明は、上記のいずれかのトランスポゾン遺伝子を転移させる方法により上記のいずれかのトランスポゾン遺伝子を移転させる段階、前段階で得た植物からDNAを抽出する段階、該DNAをトランスポゾン遺伝子内にカッティングサイトのない制限酵素で消化する段階、前段階で得たDNA断片をライゲーションする段階、前段階で得たDNA断片をPCRを行う段階、得られたPCR産物の塩基配列を決定する段階から成る、トランスポゾン遺伝子の挿入領域を特定する方法であって、このPCRを行うために用いるプライマーとして、配列番号1で表される塩基配列の5'末端から少なくとも10塩基、好ましくは10~20塩基、より好ましくは10~15塩基のオリゴヌクレオチド及び配列番号1で表される塩基配列の3'末端から少なくとも10塩基、好ましくは10~20塩基、より好ましくは10~15塩基のオリゴヌクレオチド又はこれらに相補的なオリゴヌクレオチドを用いる方法である。このプライマーは、このオリゴヌクレオチドの塩基数が15塩基以下の場合には、塩基配列の5'末端から10~15塩基のオリゴヌクレオチドは、配列番号1で表される塩基配列の3'末端から10~15塩基を兼ねることができるので、一種類とすることができる。即ち、この場合には、PCRを行うために用いるプライマーとして、配列番号1で表される塩基配列の5'末端から10~15塩基のオリゴヌクレオチド又はこれに相補的なオリゴヌクレオチドを用いればよい。このようにしてトランスポゾン遺伝子の挿入領域を特定することができれば、トランスポゾン遺伝子の挿入により破壊された遺伝子を知ることができる。

#### 図面の簡単な説明

第1図は、アクセッションナンバーAP002843の遺伝子配列の一部(配列番号6)を示す。トランスポゾンに特徴的な逆向き反復配列がLTRの直後の144459-144473及び144874-144888の場所に存在している。

第2図は、4種のイネ品種の成葉のトランスポゾンDNAを含む領域(アクセッションナンバーAP002843)のアガロースゲル電気泳動を示す(実施例2)。日本晴において約850bpのバンドが得られ、トランスポゾン遺伝子(430bp)が挿入されていることを示す。一方、コシヒカリ、ひとめぼれ、ヤマホウシでは



約 420 bp のバンドが得られ、トランスポゾン遺伝子が挿入されていないことを示す。

第 3 図は、日本晴の種子由来カルスのトランスポゾン DNA を含む領域（アクセッションナンバー AP002843）のアガロースゲル電気泳動を示す（比較例 1）。

- 5 第 4 図は、日本晴の葯由来カルスのトランスポゾン DNA を含む領域（アクセッションナンバー AP002843）のアガロースゲル電気泳動を示す（実施例 3）。420 bp のバンドはトランスポゾン遺伝子が欠失していることを示す。

- 第 5 図は、日本晴の葯由来カルスのアガロースゲル電気泳動を示す（実施例 4）。No. 1 は日本晴（コントロール）、No. 2～10 は葯由来カルスからの再分化植物体を示す。トランスポゾン DNA 中の配列から成るプローブを用いた。No. 2 と No. 6 に、コントロールの日本晴品種にはない新たな位置にバンド（矢印）が確認できる。
- 10

第 6 図は、実施例 4 にて再分化した稲のなかに、形質が変異したものがあることを示す写真である。この稲は葉が縮れて短い。

- 15 第 7 図は、日本晴の種子由来カルスのトランスポゾン DNA を含む領域のアガロースゲル電気泳動を示す（実施例 5）。上段の数字は 5-アザシチジンの濃度を示す。300 bp のバンドはトランスポゾン遺伝子（430 bp）が欠失していることを示す。

- 第 8 図は、トランスポゾン遺伝子（430 bp）が欠失している 4 種のクローンの塩基配列を示す。
- 20

第 9 図は、配列番号 2 及び 3 で表される塩基配列を有するトランスポゾン遺伝子の構造を示す。

第 10 図は、ジャポニカ（AP004753 及び AP003714）とインディカ（Scaffold6962）における配列番号 3 で表される塩基配列の相同性を示す。

- 25 第 11 図は、インディカにおけるトランスポゾン（配列番号 1、430bp）の変異頻度を示す。

第 12 図は、配列番号 2 の ORF II と配列番号 3 の ORF II のアミノ酸配列の比較を示す。これらの相同性は 75% 以上（77.8%）であり（図中、相同箇所を \* 印で示す。）、共に DXG/AF/F motif と YREK motif を有する。上段は配

列番号4のアミノ酸配列（配列番号2の ORFII に相当する。）、下段は配列番号5のアミノ酸配列（配列番号3の ORFII に相当する。）を示す。

第13図左は、日本晴の薬由来カルのトランスポゾンDNAを含む領域（アクセッションナンバーAP004236）のアガロースゲル電気泳動を示す（実施例6）。

- 5 1. 2 Kb のバンドはトランスポゾン遺伝子が欠失していることを示す。第13図右は、日本晴の種子由来カルのトランスポゾンDNAを含む領域（アクセッションナンバーAP004236）のアガロースゲル電気泳動を示す（比較例2）。

- 第14図は、各品種における自立的トランスポゾン遺伝子（配列番号2、図の上に示す。）の有無を示す電気泳動図である（実施例7）。日本晴（1）とコシヒカリ（2）には自立的トランスポゾン遺伝子（配列番号2）を示すバンド（矢印）が見られるが、台中65号（3）とカサラス（4）にはこのバンドが見られない。
- 10

- 第15図は、日本晴の自立的トランスポゾン遺伝子（配列番号2）を導入した台中65号の薬由来カルの電気泳動図である（実施例8）。台中65号には見られなかった自立的トランスポゾン遺伝子（配列番号2）を示すバンド（矢印）が
- 15 自立的トランスポゾン遺伝子（配列番号2）を導入した台中65号の薬由来カルス（No.3-6）に確認される。

- 第16図は、日本晴の自立的トランスポゾン遺伝子（配列番号2）を導入した台中65号の薬由来カルの非自立的トランスポゾン遺伝子を含む領域の電気泳動図である（実施例8）。L06 遺伝子座において非自立的トランスポゾン遺伝子が欠失したと思われるサイズのバンドが観察された（矢印）。
- 20

第17図は、L02 遺伝子座に存在する非自立的トランスポゾン遺伝子が欠失したと思われるサイズのバンドのDNA断片の塩基配列を示す。非自立的トランスポゾン遺伝子配列（配列番号1）が欠失している。

- 第18図は、L06 遺伝子座に存在する非自立的トランスポゾン遺伝子が欠失したと思われるサイズのバンドのDNA断片の塩基配列を示す。非自立的トランスポゾン遺伝子配列（配列番号1）が欠失している。
- 25

#### 発明の実施の形態

本発明は、まず、全長430bpのイネの非自立的トランスポゾン遺伝子（配

列番号1)である。このトランスポゾン遺伝子は、15bpのターミナルインバーテッドリピートを有し、215bp (CT)より対称構造をしている。

次に、2種類のトランスポゾン遺伝子(配列番号2及び3)は、共にトランスポゼース(配列番号4及び5)をコードしており、自立的トランスポゾンである。

- 5 自立的トランスポゾンとは、トランスポゼースをコードしているのが特徴であり、自ら可動でき、非自立的トランスポゾンの転移を誘発するものである。一方、非自立的トランスポゾンとは、このトランスポゼースが欠失したものであり、自ら可動できず、可動には自立的トランスポゾンの助けが必要である。構造上、自立的トランスポゾンと非自立的トランスポゾンを比較すると、欠失した以外の領域では相同性が保存されているのが特徴である。

- 10 本発明のトランスポゾンをもつ植物、本発明のトランスポゾンで形質転換された植物、また本発明のトランスポゼース遺伝子をもつ植物、又は本発明のトランスポゼース遺伝子で形質転換された植物は、放射線照射、薬剤による処理、又は薬培養等によって活性化させることにより、本発明のトランスポゾンに移転
- 15 させることができる。このような手段によってトランスポゾンが顕著に活性化するため、容易に人工的なトランスポゾンの転移が起こる。

- 薬剤による処理は、イネ等の植物の種子、葉、根、茎若しくは腋芽、又はそれに由来のカルスを薬剤で処理して行う。薬剤、例えば、5-アザシチジン又は5-アザデオキシシチジン、による処理を行うためには、これら薬剤を0.01～
- 20 5mM、好ましくは0.05～2mM含んだ固体又は液体培地に、これら植物のカルスを移植して行うのが一般である。このカルスとは、根、葉、茎などの植物器官をオーキシンやサイトカイニンを適量添加した培地で、組織培養することにより、分化している植物器官より脱分化して形成された細胞塊をいう。この細胞塊は未分化で、分化全能性を持つ。分化全能性とは、芽、根などの新たな器官
- 25 に再分化する能力であり、例えば、カルスを介することで1枚の葉から、数百のクローン植物体を得ることが可能である。

また、薬培養は、半数体育種法の一つであり、イネのおしべの先端にある薬を取り出して、オーキシン等のホルモンを主体とし、コルシチン等の倍数処理剤等を添加した培地で培養する。薬は遺伝子を一組しか有さない半数体であるが、半

数体は倍化しやすいため、容易に純系を得ることができる。イネの薬由来カルスは、培養期間が長くなると、自然に倍化し半数体倍化系統になる。このカルスを再分化培養すれば、変異植物体であるホモ型の種子が得られる。この再分化培地としては、サイトカイニン等のホルモンを主体とした培地を用いる。

- 5      また、トランスポゾンの配列中の適当な2つの配列をプライマーとして用いてPCR法により作製したプローブを用いれば、転移したトランスポゾンが挿入されることにより破壊された遺伝子を特定することができる。このように形質転換されたイネの変異体とその遺伝子との相関を解明することにより、その遺伝子の機能を知ることができる。
- 10      トランスポゾンタグ系統より破壊された遺伝子を簡便に同定することは、もっとも重要な課題である。トランスポゾン挿入位置の調べるには、トランスポゾディスプレイなどさまざまな手法があるがそれぞれ煩雑な操作が必要である。そこで本発明者は、inverse PCR 法を用いた簡便な方法を確立した。この際、トランスポゾン内に設計したPCRプライマーが成功の鍵を握る。植物体などよりゲノムDNAを抽出後、トランスポゾン内にカッティングサイトのない制限酵素（本実験ではAluIを使用）で消化し、ライゲースで（セルフ）ライゲーションを行う。これをテンプレートとし、配列番号1で表される塩基配列の5'末端から少なくとも10塩基のオリゴヌクレオチド及び配列番号1で表される塩基配列の3'末端から少なくとも10塩基のオリゴヌクレオチド又はこれらに相補的なオリゴヌクレオチド、特にターミナルインバーテットリピート領域（配列番号1で表される塩基配列の5'末端から15塩基、及び3'末端から15塩基の領域）に作成したPCRプライマーを用いてPCRを行い、得られたPCR産物の塩基配列を決定し、トランスポゾンの挿入位置を知ることができる。
- 15      非自立的トランスポゾン遺伝子（配列番号1）の利用法の一つとして、この非
- 20      自立的トランスポゾン遺伝子の内部にエンハンサー又はプロモーターを挿入し、これらを非自立的トランスポゾンと共に転移させることができる。即ち、エンハンサーやプロモーター等が挿入された遺伝子をイネその他の植物に導入して、薬培養や薬剤処理することにより、この遺伝子の転移を誘発すれば、この遺伝子の転移先の近傍にある別の遺伝子を積極的に発現させることが可能になり、その結

果、効率よく gain of function の変異体を作出することができる。このプロモーターとして、例えば、カリフラワーモザイクウイルスの 35S プロモーターなどを用いることができ、またエンハンサーとしては、例えば、カリフラワーモザイクウイルスの 35S プロモーター中のエンハンサー領域 (-90~-440) を 4 つ  
5 タンデムにつないだものなど、を挙げることができる。エンハンサーの挿入箇所は、配列番号 1 の遺伝子内のインバーテットリピート領域を除いた場所であれば、特に制限はない。またプロモーターの挿入箇所は、配列番号 1 の遺伝子内のインバーテットリピート領域を除いた場所でメチオニンが下流になれば、特に制限はない。これらは、共にトランスポゾンの転移に支障がなければ、配列番号 1 の  
10 250 b p 付近に挿入することが好ましい。エンハンサーやプロモーター等の挿入方法は、配列番号 1 の塩基配列を二分するような制限酵素サイトもしくは、PCR 法を用いてその中にクローニングサイトを作成して、挿入することができる。

#### 発明の効果

- 15 本発明は、従来イネにおいて可動性を示すトランスポゾン遺伝子は知られていなかったが、可動性を示すイネのトランスポゾン遺伝子を始めて明らかにした。更に、発明者は、薬培養等の簡単な手段によって、非自立的トランスポゾン遺伝子が転移することを確認した。即ち、人為的に非自立的トランスポゾン遺伝子を転移させる手段を提供することに成功した。
- 20 また実施例において、薬培養等の人為的操作により、非自立的トランスポゾン遺伝子が欠失することを明らかにし、更に、非自立的トランスポゾン遺伝子が挿入された遺伝子座を直接確認した。このように人為的に転移させることのできるトランスポゾン遺伝子を見出すことができたため、人為的にトランスポゾンタギング系統をイネで初めて作出することに成功した。
- 25 更に、本発明は、イネの自立的トランスポゾン遺伝子（配列番号 2 及び 3）を明らかにし、更に、これらに含まれるトランスポゼース遺伝子を明らかにした。発明者は、このような自立的トランスポゾン遺伝子を導入したイネにおいて、薬培養や薬物投与という簡単な手段によって、このトランスポゾン遺伝子が転移することを確認した。即ち、本発明は、この自立的トランスポゾン遺伝子やラン

スボゼース遺伝子を、イネその他の植物に導入して、これら人為的操作を施すことにより、これら植物を容易に人為的に形質転換する手段を提供する。

本発明の自立的トランスポゾンの利用法として、これを変異源として利用し、イネやその他の植物において、トランスポゾンタグ系統を作出することができる。

- 5 本発明を利用して、ランダムに本トランスポゾンを転移させた系統を数万系統をつくり出すことができる。自然界で生育した植物での転移は非常に稀であるため、植物組織培養により誘導した葯由来カルスや5-アザシチジン処理した種子由来カルスなどにより高頻度に転移を誘発する。イネ以外の植物においても形質転換法により本発明の自立的トランスポゾンを導入すれば、同様に転移を誘発する
- 10 ことが可能である。このようにして得た変異体は、遺伝学的解析法や逆遺伝学的解析法により解析することができる。

- この遺伝学的解析法とは、変異体の表現型からその原因遺伝子を単離する方法であり、本トランスポゾンと変異体の表現型がリンクしていれば、このタグ（トランスポゾン）を利用して、容易に原因遺伝子の単離を行える。たとえば、塩に
- 15 強いイネを探したければ、トランスポゾンタグ系統の種子から培養したイネの耐塩性を調べて、所望のイネを選べばよい。

- また、逆遺伝学的解析法とは、遺伝子からその遺伝子の機能が失われた変異体を単離する方法である。多数の変異体よりDNAを抽出し、プールを作る。トランスポゾンタグ系統のDNAを購入し、その中から、目的の遺伝子にトランスポ
- 20 ゾンが挿入した変異体をPCR法により釣りあげることができる。

- さらに、近年のゲノムプロジェクトにより、網羅的な解析として、イネの全遺伝子に対応した、変異体を作出し、トランスポゾンの挿入位置をデータベース化することもできる。利用者は、目的にあわせてデータベースを検索してヒットした変異体の種子をオーダーすることができる。

25

以下、実施例により本発明を例証するが、これらは本発明を制限することを意図したものではない。

#### 実施例 1

イネ品種、日本晴の成葉からDNAを抽出した (Kikuchi et al. (1998) Plant

Biotechnology 15: 45-48)。トランスポゾンDNAの両端にある逆向き反復配列間の領域をPCR法によって増幅するため、PCRプライマーとして配列番号7のDNA配列を有するオリゴヌクレオチドを用いた。PCRには、GeneAmp9600システム (ABI 社) を使用して行った。反応液100 $\mu$ l中には、200ng DNA、2.5 units TaKaRa Ex Taq (TaKaRa 社)、10 $\mu$ l 10 $\times$ Ex Taq バッファー、8 $\mu$ l dNTP Mixture(2.5 mM each)、200pmol プライマーが含まれる。PCRの条件は、94 $^{\circ}$ Cで30秒間のディネーチャー、55 $^{\circ}$ Cで1分間のアニール、72 $^{\circ}$ Cで12分間の伸長反応を1サイクルとし、35サイクル反応させた。反応後、1% SeaKem GTG アガロース (FMC 社) で分画した。増幅された約450bpのDNA断片をゲルから回収し、TAクローニングキット (In Vitrogen) を用いたプラスミドpCRII-TOPOにサブクローニングした。得られたクローンの塩基配列を310 DNAシーケンサー (ABI 社) を用いて決定した。決定された塩基配列は430bpから成る配列番号1に示すものであった。

## 15 実施例2

4種のイネ品種 (日本晴、コシヒカリ、ひとめぼれ、及びヤマホウシ) の成葉からDNAを抽出した。トランスポゾンDNAを含む領域 (アクセッションナンバーAP002843) をPCR法によって増幅するため、PCRプライマーとして配列番号8と配列番号9のDNA配列を有するオリゴヌクレオチドを用いた。反応液100 $\mu$ l中には、200ng DNA、2.5 units AmpliTaq Gold (ABI 社)、10 $\mu$ l GeneAmp 10 $\times$ PCR バッファー (contains 15 mM MgCl<sub>2</sub>)、10 $\mu$ l Gene Amp Mixture (2 mM each dNTP)、200pmol プライマーが含まれる。PCRの条件は、96 $^{\circ}$ Cで30秒間のディネーチャー、55 $^{\circ}$ Cで1分間のアニール、72 $^{\circ}$ Cで1分間の伸長反応を1サイクルとし、35サイクル反応させた。反応後、2% LO3 アガロース (TaKaRa 社) で分画した。第2図にこのアガロースゲル電気泳動を示す。日本晴においてのみ、約850bpのバンドが得られた。約850bpのバンドは実施例1で示した配列番号1のトランスポゾン遺伝子 (430bp) が挿入されている断片である。一方、コシヒカリ、ひとめぼれ、及びヤマホウシでは、約420bpのバンドが得られ、トランスポゾン遺伝子が挿入されていない断片で

あった。このような品種間で日本晴にのみ特異的であるということは、この遺伝子がトランスポゾンとしての機能を有する可能性を示唆している。

#### 比較例 1

- 5 日本晴の種子を、3%次亜塩素酸ナトリウム溶液で15～30分間の殺菌、滅菌水で洗浄し、9個の種子を20～30ml培地の入った90×20mmのシャーレ (iwaki 社) 内に置床し、30℃の温度、24時間明所で誘導培養した。1 Lの培地中に、4 gのCHU(N6) Basal Salt Mixture (siguma 社)、1 ml MS vitamin solution (siguma 社)、2 mg / 1 2,4-ジクロルフェノキシ酢酸 (siguma 社)、
- 10 0.3g casamino acids (DIFCO)、0.1g myo-inositol (siguma)、2.878g プロリン (WAKO)、30 g スクロース (WAKO)、2 g gelrite (WAKO) を含む固体培地を使用した。誘導培養10日目に、誘導された種子由来カルスは、20～30ml培地の入った90×20mmのシャーレ (iwaki 社) 内に移植し、30℃の温度、24時間明所で増殖培養した。1 Lの培地中に、4 gのCHU(N6) Basal Salt
- 15 Mixture (siguma 社)、1 ml MS vitamin solution (siguma 社)、2 mg / 1 2,4-ジクロルフェノキシ酢酸 (siguma 社)、0.3g casamino acids (DIFCO)、0.1g myo-inositol (siguma)、2.878g プロリン (WAKO)、30 g スクロース (WAKO)、2 g gelrite (WAKO) を含む固体培地を使用した。

- 増殖培養2週間目の種子由来カルスよりDNAを抽出した。トランスポゾンDNAを含む領域をPCR法によって増幅するため、実施例2と同様にPCRプライマーとして配列番号8と配列番号9のDNA配列を有するオリゴヌクレオチドを用いた。反応液100  $\mu$  l 中には、200 ng DNA、2.5 units AmpliTaq Gold (ABI 社)、10  $\mu$  l GeneAmp 10×PCR バッファー (contains 15 mM MgCl<sub>2</sub>)、10  $\mu$  l Gene Amp Mixture (2 mM each dNTP)、200 pmol プライマーが含まれる。PCR
- 25 Rの条件は、96℃で30秒間のディネーチャー、55℃で1分間のアニール、72℃で1分間の伸長反応を1サイクルとし、35サイクル反応させた。反応後、2% LO3 アガロース (TaKaRa 社) で分画した。第3図にこのアガロースゲル電気泳動を示す。約850 bpの1本のバンドのみが得られた。約850 bpのバンドは、トランスポゾン遺伝子が挿入されたままのサイズである。期待された



トランスポゾン遺伝子が欠失したバンドのサイズである約420bpのバンドは得られなかった。約420bpのバンドの得られる確率は64カルス中0カルス(0%)であった。これにより、種子(胚盤)由来カルスにおいてトランスポゾン遺伝子は動いていないことが認められた。

5

### 実施例3

- 日本晴の出穂前の穂を採取し、10℃の温度で、10日間の低温処理を行った後、1%次亜塩素酸ナトリウム溶液で1分間の殺菌、滅菌水で洗浄し、穎花から葯を摘出し、50個の葯を3ml液体培地の入った35×10mmのシャーレ
- 10 (CORNING 社) 内に置床し、30℃の温度、24時間明所で誘導培養した。1Lの培地中に、4gのCHU(N6) Basal Salt Mixture (siguma 社)、1ml MS vitamin solution (siguma 社)、2mg/l 2,4-ジクロルフェノキシ酢酸 (siguma 社)、30g スクロース (WAKO) を含む液体培地を使用した。誘導培養3~4週間目に、誘導された葯由来カルスは、20~30ml培地の入った90×20mmのシャ
- 15 ーレ (iwaki 社) 内に移植し、30℃の温度、24時間明所で増殖培養した。1Lの培地中に、4gのCHU(N6) Basal Salt Mixture (siguma 社)、1ml MS vitamin solution (siguma 社)、2ml  $\alpha$ -Naphthalene Acetic Acid solution (siguma 社)、2ml kinetin solution (siguma 社)、3g casamino acids (DIFCO)、30g スクロース (WAKO)、2g gelrite (WAKO) を含む固体培地を使用した。
- 20 増殖培養2週間目の葯由来カルスよりDNAを抽出した。トランスポゾンDNAを含む領域をPCR法によって増幅するため、実施例2と同様にPCRプライマーとして配列番号8と配列番号9のDNA配列を有するオリゴヌクレオチドを用いた。反応液100 $\mu$ l中には、200ng DNA、2.5 units AmpliTaq Gold (ABI 社)、10 $\mu$ l GeneAmp 10×PCR バッファー (contains 15 mM MgCl<sub>2</sub>)、10
- 25  $\mu$ l Gene Amp Mixture (2 mM each dNTP)、200pmol プライマーが含まれる。PCRの条件は、96℃で30秒間のディネーチャー、55℃で1分間のアニール、72℃で1分間の伸長反応を1サイクルとし、35サイクル反応させた。反応後、2% LO3 アガロース (TaKaRa 社) で分画した。第4図にこのアガロースゲル電気泳動を示す。図中、約850bp と約420bp の2本のバンドが得られ

た。約850bpのバンドは、トランスポゾン遺伝子が挿入されたままのサイズである。一方、約420bpのバンドは、トランスポゾン遺伝子が欠失したことを示す。約420bpのバンドの得られる確率は、64カルス中、11カルス(17.2%)であった。

- 5     なお、本実施例においてトランスポゾン遺伝子が欠失したサイズの約420bpのバンドが得られた薬由来カルスのうち、増幅された約420bpのDNA断片(N=5)をゲルから回収し、TAクローニングキット(In Vitrogen)を用いたプラスミドpCRII-TOPOにサブクローニングした。得られたクローンについて、塩基配列を310 DNAシーケンサー(ABI社)を用いて決定した。これらの塩基配
- 10   列を比較したところ、トランスポゾン遺伝子配列は見られなかった(その結果はここには示さない)。これにより、トランスポゾン遺伝子の欠失が塩基配列からも確認された。

- 比較例1においては、胚盤(種子)由来の培養細胞ではトランスポゾン遺伝子の可動性は認められなかったのに対して、本実施例においては、薬由来の培養細胞においてトランスポゾン遺伝子の極めて高頻度の可動性が認められた。
- 15

#### 実施例4

- 日本晴の出穂前の穂を採取し、10℃の温度で、10日間の低温処理を行った後、1%次亜塩素酸ナトリウム溶液で1分間の殺菌、滅菌水で洗浄し、顕花から、
- 20   薬を摘出し、50個の薬を3ml液体培地の入った35×10mmのシャーレ(CORNING社)内に置床し、30℃の温度、24時間明所で誘導培養した。1Lの培地中に、4gのCHU(N6) Basal Salt Mixture (siguma社)、1ml MS vitamin solution (siguma社)、2mg/1 2,4-ジクロロフェノキシ酢酸 (siguma社)、30g スクロース (WAKO) を含む液体培地を使用した。誘導培養3~4週間目に、
- 25   誘導された薬由来カルスは、20~30ml培地の入った90×20mmのシャーレ(iwaki社)内に移植し、30℃の温度、24時間明所で増殖培養した。1Lの培地中に、4gのCHU(N6) Basal Salt Mixture (siguma社)、1ml MS vitamin solution (siguma社)、2ml α-Naphthalene Acetic Acid solution (siguma社)、2ml kinetin solution (siguma社)、3g casamino acids (DIFCO)、30g スクロ

ース (WAKO)、2 g gelrite (WAKO) を含む固体培地を使用した。

増殖培養2週間目に増殖した薬由来カルスは、20～30ml 培地の入った90×20mmのシャーレ (iwaki 社) 内に移植し、30℃の温度、24時間明所で再分化培養した。1Lの培地中に、4.3gのMS Basal Salt Mixture (Gibcobl社)、1ml MS vitamin solution (siguma 社)、10ml 6-Benzylamino-purine solution (siguma 社)、2ml α-Naphthalene Acetic Acid solution (siguma 社)、2 g casamino acids (DIFCO)、30 g solbitol (WAKO) 30 g スクロース (WAKO)、2 g gelrite (WAKO) を含む個体培地を使用した。再分化培養3～4週間目に再生していきたく植物体は生育培地に内に移植され、大きくなったところで土に植えかえた。生育培地は、1Lの培地中に、4.3gのMS Basal Salt Mixture (Gibcobl 社)、1ml MS vitamin solution (siguma 社)、30 g スクロース (WAKO)、2 g gelrite (WAKO) を含む固体培地を使用した。

薬由来カルスから再分化した、9個体の幼苗より、CTAB法によってDNAを抽出した。抽出したDNAを制限酵素HindIIIで消化後、0.8% LO3 アガロース (TaKaRa 社) で分画し、アルカリブロットイング法でナイロンメンブレン (HybondN+) (Amersham 社) に転写した。サザンハイブリダイゼーションは、DIG発光検出キット (Roche 社) を用いて行った。プローブの作製には、PCR DIGプローブ合成キット (Roche 社) を用いた。トランスポゾンDNAの内部領域をPCR法によって増幅するため、PCRプライマーとして配列番号10と配列番号11のDNA配列 (いずれも配列番号1 (トランスポゾン遺伝子) 中の配列である。) を有するオリゴヌクレオチドを用いプローブを作製した。第5図にこのアガロースゲル電気泳動を示す。第5図に示すように、No. 2及びNo. 6においてコントロールの日本晴品種にはない新たな位置にバンド (矢印) が現れた。このバンドは、トランスポゾン遺伝子が挿入されて破壊された遺伝子座を示している。

本実施例により、新たな遺伝子座へのトランスポゾン遺伝子の挿入が明らかになった。なお、本実施例にて再分化した稲には第6図に示すような形質が変異したものが認められ (遺伝子は未確認)、このような形質に関連する遺伝子がこのようなトランスポゾンによって破壊されていることが示唆される。

実施例 5

日本晴の種子を、3%次亜鉛素酸ナトリウム溶液で15~30分間の殺菌、滅菌水で洗浄し、9個の種子を20~30ml培地の入った90×20mmのシャーレ (iwaki社) 内に置床し、30℃の温度、24時間明所で誘導培養した。1Lの培地中に、4gのCHU(N6)Basal Salt Mixture(siguma社)、1ml MS vitamin solution(siguma社)、2mg/l 2,4-Dichloro-phenoxyacetic acid(siguma社)、0.3g casamino acids(DIFCO)、0.1g myo-inositol(siguma)、2.878g prorine (WAKO)、30g sucrose (WAKO)、2g gelrite (WAKO)を含む固体培地を使用した。

数日後、イネの種子内の胚盤組織より、カルスが形成され始め、10日目には、5mm程度のクリーム色のカルスとなった。この5mm程度のクリーム色のカルスを、5-アザシチジン (5-azacytidine、siguma社) を0mM、0.01mM、0.03mM、0.05mM、0.1mM、0.3mMの濃度で含む増殖培地に移植し、30℃の温度、24時間明所で増殖培養した。1Lの培地中に、4gのCHU(N6)Basal Salt Mixture(siguma社)、1ml MS vitamin solution(siguma社)、2mg/l 2,4-Dichloro-phenoxyacetic acid(siguma社)、0.3g casamino acids(DIFCO)、0.1g myo-inositol(siguma)、2.878g prorine(WAKO)、30g sucrose(WAKO)、2g gelrite(WAKO)を含む固体培地を使用した。

増殖培養2週間目の種子由来カルスより、Dneasy plant mini kit (QIAGEN) によりDNAを抽出した。トランスポゾンDNAを含む領域をPCR法によって増幅するため、PCRプライマーとして配列番号12と配列番号13のDNA配列を有するオリゴヌクレオチドを用いた。PCR反応液は、HotStarTaq Master Mix kit (QIAGEN) を使用した。PCRの条件は、96℃で30秒間のディネーチャー、55℃で1分間のアニール、72℃で1分間の伸長反応を1サイクルとし、45サイクル反応させた。反応後、2% LO3 agarose (TaKaRa社) で分画した。

0.03mM-0.3mMの5-アザシチジン添加区において、約730bpと約300bpの2本のバンドが得られた(第7図)。約730bpのバンドは、トランスポゾン遺伝子が挿入されたままのサイズである。一方、約300bp

のバンドは、トランスポゾン遺伝子（430bp）が欠失したバンドのサイズであった。

これらのDNA断片をゲルから回収し、TAクローニングキット（In Vitrogen）を用いたプラスミドpCRII-TOPOにサブクローニングした。得られた4種類のクローンについて、塩基配列を310 DNAシーケンサー（ABI社）を用いて決定した。4種類のクローンの塩基配列を比較した（第8図）。その結果、トランスポゾン遺伝子配列は全く見られなかった。

本実施例により、種子由来カルスにおいても、脱メチル化剤である5-アザシチジンを使用することで、本トランスポゾンの転移を誘発することが可能であることが分かった。これにより、1粒の種子より、本トランスポゾンが転移した数百のクローン植物体を得ることができると期待される。

#### 実施例6

イネ品種、日本晴の出穂前の穂を採取し、10℃の温度で、10日間の低温処理を行った後、1%次亜塩素酸ナトリウム溶液で1分間の殺菌、滅菌水で洗浄し、穎花から、葯を摘出し、50個の葯を3ml液体培地の入った35×10mmのシャーレ（CORNING社）内に置床し、30℃の温度、24時間明所で誘導培養した。1Lの培地中に、4gのCHU(N6) Basal Salt Mixture（siguma社）、1ml MS vitamin solution（siguma社）、2mg/l 2,4-Dichloro-phenoxyacetic acid（siguma社）、30g sucrose（WAKO）を含む液体培地を使用した。誘導培養3～4週間目に、誘導された葯由来カルスは、20～30ml培地の入った90×20mmのシャーレ（iwaki社）内に移植し、30℃の温度、24時間明所で増殖培養した。1Lの培地中に、4gのCHU(N6) Basal Salt Mixture（siguma社）、1ml MS vitamin solution（siguma社）、2ml α-Naphthalene Acetic Acid solution（siguma社）、2ml kinetin solution（siguma社）、3g casamino acids（DIFCO）、30g sucrose（WAKO）、2g gelrite（WAKO）を含む固体培地を使用した。増殖培養2週間目の葯由来カルスよりDNAを抽出した（Kikuchi et al. (1998) Plant Biotechnology 15: 45-48）。トランスポゾンDNAを含む領域をPCR法によって増幅するため、PCRプライマーと

して配列番号14 (AP004236 の 88933-88962) と配列番号15 (AP004236 の 95545-95574) の DNA 配列を有するオリゴヌクレオチドを用いた。反応液 100  $\mu$ l 中には、200ng DNA、2.5 units TaKaRa LA Taq (TaKaRa 社)、10  $\mu$ l 10 $\times$ LA PCR BufferII、6  $\mu$ l 25 mM MgCl<sub>2</sub>、8  $\mu$ l dNTP Mixture (2.5mM each dNTP)、100pmol primer が含まれる。PCR の条件は、94℃で 30 秒間のディネーチャー、68℃で 12 分間の伸長反応を 1 サイクルとし、35 サイクル反応させた。反応後、0.8% LO3 agarose (TaKaRa 社) で分画した。約 6.6kbp のバンドは、本発明のトランスポゾン遺伝子 (5341 bp) が挿入されたままのサイズである。本発明のトランスポゾン遺伝子は約 5.4kbp であるため、このトランスポゾン遺伝子が欠失すると約 1.2kbp のバンドが現れるはずである。本実施例では約 1.2kbp のバンドが得られた (第13図)。これにより、薬由来カルスにおいては動いていることが明らかにされた。約 1.2kb のバンドの得られる確率は、64 カルス中、3カルス (4.7%) であった。本実施例にて、薬由来カルスにおいて配列番号2で表される DNA 配列から成るイネの MITE が動くことを証明した。

## 比較例2

イネ品種、日本晴の種子を、3%次亜塩素酸ナトリウム溶液で15~30分間の殺菌、滅菌水で洗浄し、9個の種子を20-30ml 培地の入った90 $\times$ 20mmのシャーレ (iwaki 社) 内に置床し、30℃の温度、24時間明所で誘導培養した。1Lの培地中に、4gのCHU (N6) Basal Salt Mixture (siguma 社)、1ml MS vitamin solution (siguma 社)、2mg/l 2,4-Dichloro-phenoxyacetic acid (siguma 社)、0.3g casamino acids (DIFCO)、0.1g myo-inositol (siguma)、2.878g proline (WAKO)、30g sucrose (WAKO)、2g gelrite (WAKO) を含む固体培地を使用した。誘導培養10日目に、誘導された種子由来カルスは、20-30ml 培地の入った90 $\times$ 20mmのシャーレ (iwaki 社) 内に移植し、30℃の温度、24時間明所で増殖培養した。1Lの培地中に、4gのCHU (N6) Basal Salt Mixture (siguma 社)、1ml MS vitamin solution (siguma 社)、2mg/l 2,4-Dichloro-phenoxyacetic acid (siguma 社)、0.3g

casamino acids (DIFCO)、0.1g myo-inositol (siguma)、2.878g proline (WAKO)、30g sucrose (WAKO)、2g gelrite (WAKO) を含む固体培地を使用した。増殖培養2週間目の種子由来カルスより DNA を抽出した (Kikuchi et al. (1998) Plant Biotechnology 15: 45-48)。トランスポゾン DNA を含む領域を PCR 法によって増幅するため、PCR プライマーとして配列番号14と配列番号15の DNA 配列を有するオリゴヌクレオチドを用いた。反応液 100  $\mu$ l 中には、200ng DNA、2.5 units TaKaRa LA Taq (TaKaRa 社)、10  $\mu$ l 10  $\times$ LA PCR BufferII、6  $\mu$ l 25 mM MgCl<sub>2</sub>、8  $\mu$ l dNTP Mixture (2.5mM each dNTP)、100pmol primer が含まれる。PCR の条件は、94℃で 30 秒間のディネーチャー、68℃で 12 分間の伸長反応を 1 サイクルとし、35 サイクル反応させた。反応後、0.8% L03 agarose (TaKaRa 社) で分画した。その結果、約 6.6kbp の1本のバンドのみが得られ、約 1.2kbp のバンドは得られなかった(第13図)。これにより、種子由来カルスにおいては動いていないことが明らかにされた。約 1.2kb のバンドの得られる確率は、64 カルス中、0カルス (0%) であった。

#### 実施例7

本実施例では、自立的トランスポゾン遺伝子 (配列番号2) を持っていない品種を探し、自立的トランスポゾン遺伝子 (配列番号2) の有無による非自立的トランスポゾン遺伝子の転移の差異を明らかにするため、自立的トランスポゾン遺伝子 (配列番号2) を持っていない品種の薬由来カルスを誘導し、非自立的トランスポゾン遺伝子の転移を調べた。

イネ品種、日本晴、コシヒカリ、台中 65 号、カサラスの 4 品種を用い、それぞれの品種の葉より、CTAB 法によって DNA を抽出した。抽出した DNA を制限酵素 HindIII で消化後、1.0% L03 agarose (TaKaRa 社) で分画し、アルカリブロットイング法でナイロンメンブレン (HybondN+) (Amersham 社) に転写した。サザンハイブリダイゼーションは、DIG 発光検出キット (Roche 社) を用いて行った。プローブの作製には、PCR DIG プローブ合成キット (Roche 社) を用いた。自立的トランスポゾン遺伝子に特異的な内部領域を PCR 法によって増幅

するため、PCR プライマーとして配列番号 16 と配列番号 17 の DNA 配列を有するオリゴヌクレオチドを用いプローブを作製した。サザンハイブリダイゼーションの結果、日本晴とコシヒカリには、それぞれ自立的トランスポゾン遺伝子が 1 コピーゲノム中に存在するが、台中 65 号とカサラスには、存在しないことが分かった (第 14 図)。

次に、台中 65 号の薬由来カルスを誘導し、非自立的トランスポゾン遺伝子 (配列番号 1) の転移を調べた。

イネ品種、台中 65 号の出穂前の穂を採取し、10℃の温度で、10 日間の低温処理を行った後、1%次亜塩素酸ナトリウム溶液で 1 分間の殺菌、滅菌水で洗浄し、  
10 穎花から、薬を摘出し、50 個の薬を 3ml 液体培地の入った 35×10mm のシャーレ (CORNING 社) 内に置床し、30℃の温度、24 時間明所で誘導培養した。1L の培地中に、4g の CHU(N6) Basal Salt Mixture (siguma 社)、1ml MS vitamin solution (siguma 社)、2mg/l 2, 4-Dichloro-phenoxyacetic acid (siguma 社)、30g sucrose (WAKO) を含む液体培地を使用した。誘導  
15 培養 3～4 週間目に、誘導された薬由来カルスは、20-30ml 培地の入った 90×20mm のシャーレ (iwaki 社) 内に移植し、30℃の温度、24 時間明所で増殖培養した。1L の培地中に、4g の CHU(N6) Basal Salt Mixture (siguma 社)、1ml MS vitamin solution (siguma 社)、2ml α-Naphthalene Acetic Acid solution (siguma 社)、2ml kinetin solution (siguma 社)、3g casamino  
20 acids (DIFCO)、30g sucrose (WAKO)、2g gelrite (WAKO) を含む固体培地を使用した。それぞれ増殖培養 2 週間目の薬由来カルスより、既報 (Kikuchi et al. (1998) Plant Biotechnology 15: 45-48) に記載の方法に従い、DNA を抽出した。トランスポゾン DNA を含む領域を PCR 法によって増幅するため、PCR プライマーとして配列番号 18 と配列番号 19 (L02)、配列番号 20 と  
25 配列番号 21 (L06)、配列番号 22 と配列番号 23 (L07) の DNA 配列を有するオリゴヌクレオチドを用いた。反応液 100 μl 中には、200ng DNA、2.5 units AmpliTaq Gold (ABI 社)、10 μl GeneAmp 10×PCR Buffer (contains 15 mM MgCl<sub>2</sub>)、10 μl Gene Amp Mixture (2 mM each dNTP)、200pmol primer が含まれる。PCR の条件は、96℃で 30 秒間のディネーター、55℃で 1 分間の



アニール、72℃で1分間の伸長反応を1サイクルとし、35サイクル反応させた。反応後、2% L03 agarose (TaKaRa 社) で分画した。その結果、自立的トランスポゾン遺伝子 (配列番号1) を持たない台中 65 号では、L02、L06、L07 遺伝子座に存在する非自立的トランスポゾン遺伝子の転移が起こらなかった (表 2 上)。しかし、下記比較例 3 に示すように、薬由来カルスにおいて自立的トランスポゾン遺伝子 (配列番号 2) を持つ日本晴では、10.9-31.3% と高頻度に非自立的トランスポゾン遺伝子が転移した。

表 2

|                   | L2           | L6           | L7         |
|-------------------|--------------|--------------|------------|
| 薬由来カルス            | 0/64         | 0/64         | 0/64       |
| 遺伝子導入した<br>薬由来カルス | 2/38<br>5.3% | 1/38<br>2.6% | 0/38<br>0% |

### 比較例 3

日本晴の出穂前の穂を採取し、10℃の温度で、10日間の低温処理を行った後、1%次亜塩素酸ナトリウム溶液で1分間の殺菌、滅菌水で洗浄し、顕花から薬を摘出し、50個の薬を3ml液体培地の入った35×10mmのシャーレ (CORNING 社) 内に置床し、30℃の温度、24時間明所で誘導培養した。1Lの培地中に、4gのCHU(N6) Basal Salt Mixture (siguma 社)、1ml MS vitamin solution (siguma 社)、2mg/l 2,4-ジクロロフェノキシ酢酸 (siguma 社)、30gスクロース (WAKO) を含む液体培地を使用した。誘導培養3~4週間目に、誘導された薬由来カルスは、20~30ml培地の入った90×20mmのシャーレ (iwaki 社) 内に移植し、30℃の温度、24時間明所で増殖培養した。1Lの培地中に、4gのCHU(N6) Basal Salt Mixture (siguma 社)、1ml MS vitamin solution (siguma 社)、2ml α-Naphthalene Acetic Acid solution (siguma 社)、2ml kinetin solution (siguma 社)、3g casamino acids (DIFCO)、30gスクロース (WAKO)、2g gelrite (WAKO) を含む固体培地を使用した。

増殖培養2週間目の薬由来カルスよりDNAを抽出した。トランスポゾンDNAを含む領域をPCR法によって増幅するため、実施例7と同様にPCRプライマーとして配列番号5と配列番号1のDNA配列を有するオリゴヌクレオチドを用いた。反応液100 $\mu$ l中には、200ng DNA、2.5 units AmpliTaq Gold (ABI 社)、10 $\mu$ l GeneAmp 10 $\times$ PCR バッファー(contains 15 mM MgCl<sub>2</sub>)、10 $\mu$ l Gene Amp Mixture(2 mM each dNTP)、200pmol プライマーが含まれる。PCRの条件は、96 $^{\circ}$ Cで30秒間のディネーチャー、55 $^{\circ}$ Cで1分間のアニール、72 $^{\circ}$ Cで1分間の伸長反応を1サイクルとし、35サイクル反応させた。反応後、2% LO3 アガロース (TaKaRa 社) で分画した。その結果、約850bpと約420bpの2本のバンドが得られた。約850bpのバンドは、トランスポゾン遺伝子が挿入されたままのサイズである。一方、約420bpのバンドは、トランスポゾン遺伝子が欠失したことを示す。約420bpのバンドの得られる確率は、64カルス中、11カルス (17.2%) であった。

#### 15 実施例8

本実施例では、自立的トランスポゾン遺伝子(配列番号2)を含むゲノム領域を単離し、これを自立的トランスポゾン遺伝子(配列番号2)を持っていない品種(台中65号)に導入し、非自立的トランスポゾン遺伝子(配列番号1)の転移を調べた。

20 イネ品種、日本晴より自立的トランスポゾン遺伝子(配列番号2)を含むゲノム領域を単離するため、配列番号2で表される塩基配列をはさむように配列番号24と配列番号25のDNA配列を有するオリゴヌクレオチド設計し、PCRのプライマーに用いた。日本晴の葉より、CTAB法によって抽出したDNAを用いた。反応液100 $\mu$ l中には、200ng DNA、2.5 units TaKaRa LA Taq (TaKaRa 社)、10 $\mu$ l 10 $\times$ LA PCR BufferII、6 $\mu$ l 25 mM MgCl<sub>2</sub>、8 $\mu$ l dNTP Mixture (2.5mM each dNTP)、100pmol primer が含まれる。PCRの条件は、94 $^{\circ}$ Cで30秒間のディネーチャー、68 $^{\circ}$ Cで12分間の伸長反応を1サイクルとし、35サイクル反応させた。反応後、0.8% LO3 agarose (TaKaRa 社) で分画した。自立的トランスポゾン遺伝子が挿入されている約6.6kbpのバンドが得られた。

このDNA断片(約 6.6kbp)をゲルから回収し、TA クローニングキット(In Vitrogen)を用いたプラスミド pCRII-TOPO にサブクローニングした。次に、pCRII-TOPO に存在するマルチクローニングサイト (ApaI と KpnI) を利用し、選抜マーカーとしてハイグロマイシン耐性遺伝子をもつ植物感染用のバイナリーベクターにサブクローニングし、エレクトロポレーション法により、アグロバクテリア EHA101 に導入した。感染に用いる 3 日前にカナマイシン (Wako) とハイグロマイシン (Wako) を含む AB 培地にストリークし、薬由来カルスへの感染に用いた。

次に、アグロバクテリアを介し、イネ品種、台中 65 号の薬由来カルスに、上記で得た自立的トランスポゾン遺伝子(配列番号 2)を含むゲノム領域(約 6.6kbp)を導入した。

イネ品種、台中 65 号の出穂前の穂を採取し、10℃の温度で、10 日間の低温処理を行った後、1%次亜塩素酸ナトリウム溶液で1 分間の殺菌、滅菌水で洗浄し、穎花から、薬を摘出し、50 個の薬を 3ml 液体培地の入った 35×10mm のシャーレ (CORNING 社) 内に置床し、30℃の温度、24 時間明所で誘導培養した。1L の培地中に、4g の CHU(N6) Basal Salt Mixture (siguma 社)、1ml MS vitamin solution (siguma 社)、2mg/l 2,4-Dichloro-phenoxyacetic acid (siguma 社)、30g sucrose (WAKO) を含む液体培地を使用した。誘導培養 3~4 週間目に、誘導された薬由来カルスは、20-30ml 培地の入った 90×20mm のシャーレ (iwaki 社) 内に移植し、30℃の温度、24 時間明所で増殖培養した。1L の培地中に、4g の CHU(N6) Basal Salt Mixture (siguma 社)、1ml MS vitamin solution (siguma 社)、2ml a-Naphthalene Acetic Acid solution (siguma 社)、2ml kinetin solution (siguma 社)、3g casamino acids (DIFCO)、30g sucrose (WAKO)、2g gelrite (WAKO) を含む固体培地を使用した。

増殖培養 2 週間目の台中 65 号の薬由来カルスにアグロバクテリアを感染させた。AB 培地に塗布後 3 日のアグロバクテリアをさじでかき取り、10mg/l のアセトシリンゴンを添加した AAM 培地 (25ml) に入れよく振りまぜ、混ぜた感染用の液をシャーレ (IWAKI) にいれた。増殖培養 2 週間目の薬由来カルスを金網に入

れ、2分間感染用の液に浸した。金網を滅菌したキムタオルの上に置き、余分な水分を除去後、ピンセットでろ紙を敷いた共存培地にカルスをのせ、サージカルテープでシールして28℃暗黒下で3日間培養した。共存培地は、1Lの培地中に4gのCHU(N6)Basal Salt Mixture (Siguma 社)、1ml MS Vitamin Solution (Siguma 社)、30g Sucrose (WAKO)、10g Glucose (WAKO)、2mg/l 2,4-Dichloro-phenoxyacetic acid (Siguma 社)、2g Gelrite (WAKO)、10mg acetosyringone を含む固体培地を使用した。共存培養3日のカルスを100ml 滅菌水の入った三角フラスコに入れよく振り混ぜた後、水のみ捨てる。滅菌水での洗浄を数回くり返したのち、500mg/ml のカルベニシリンを入れた洗浄液で洗った後、選抜培地にカルスを1シャーレに9個置床、サージカルテープでシールし25℃明所で1ヶ月培養した。選抜培地は、1Lの培地に、4gのCHU(N6)Basal Salt Mixture (Siguma 社)、1ml MS Vitamin Solution (Siguma 社)、30g Sucrose (WAKO)、0.3g Casamino Acids (DIFCO)、2.878g Prorin (ICN)、0.1g Mio-inositol (Siguma 社)、2mg/l 2,4-Dichloro-phenoxyacetic acid (Siguma 社)、500mg Hygromycin (Wako)、50mg Carbenisillin (Wako)、2g Gelrite (WAKO)を含む固体培地を使用した。

次に、選抜培地置床3-4週間後、増殖してきたハイグロマイシン耐性カルスについて、日本晴の自立的トランスポゾン遺伝子の導入と非自立的トランスポゾン遺伝子(配列番号1)の転移を調べた。

耐性カルスより、既報 (Kikuchi et al. (1998) Plant Biotechnology 15: 45-48) に記載の方法に従い、DNAを抽出した。配列番号2で表される塩基配列をはさむように設計した配列番号24と配列番号25のDNA配列を有するオリゴヌクレオチドをPCRのプライマーに用いてPCR反応を行った。反応液100μl中には、200ng DNA、2.5 units TaKaRa LA Taq (TaKaRa 社)、10μl 10×LA PCR BufferII、6μl 25 mM MgCl<sub>2</sub>、8μl dNTP Mixture (2.5mM each dNTP)、100pmol primer が含まれる。PCRの条件は、94℃で30秒間のディネーチャー、68℃で12分間の伸長反応を1サイクルとし、35サイクル反応させた。反応後、0.8% LO3 agarose (TaKaRa 社) で分画した。結果、

耐性カルスにおいて、日本晴の自立的トランスポゾン遺伝子の導入を確認することができた（第15図）。

次に、非自立的トランスポゾン遺伝子を含む領域をPCR法によって増幅するため、PCRプライマーとして配列番号18と配列番号19（L02）、配列番号20と配列番号21（L06）、配列番号22と配列番号23（L07）のDNA配列を有するオリゴヌクレオチドを用いた。PCR反応液は、HotStarTaq Master Mix kit（QIAGEN）を使用した。PCRの条件は、96℃で30秒間のディネーチャー、55℃で1分間のアニール、72℃で2分間の伸長反応を1サイクルとし、45サイクル反応させた。反応後、2% L03 agarose（TaKaRa）で分画した。その結果、38個の自立的トランスポゾン遺伝子が導入されたカルスについて非自立的トランスポゾン遺伝子の欠失を調べたところ、L06遺伝子座において欠失したと思われるサイズのバンドが得られた（第16図）。L02、L06、L07遺伝子座に存在する非自立的トランスポゾン遺伝子の欠失頻度は、0～5.3%程度であった（表2下）。

L02とL06遺伝子座に存在する非自立的トランスポゾン遺伝子が欠失したと思われるサイズのバンドのDNA断片をゲルから回収し、TAクローニングキット（In Vitrogen）を用いたプラスミドpCRII-TOPOにサブクローニングした。得られたクローンについて、塩基配列を310 DNAシーケンサー（ABI社）を用いて決定した。非自立的トランスポゾン遺伝子配列は見られなかった（第17図、第18図）。

この結果は、日本晴の自立的トランスポゾン遺伝子を導入することで台中65号の薬由来カルスにおいて非自立的トランスポゾン遺伝子の転移を誘発したことを示している。これにより、配列番号2で表される塩基配列から成るトランスポゾンは、薬由来カルスにおいて自立的に転移するとともに、非自立的トランスポゾン遺伝子の転移を制御すると結論できる。

#### 実施例9

本実施例では、配列番号3で表される塩基配列の転移活性を、薬由来カルスと5-アザシチジン処理した胚盤由来カルスについて調べた。

イネ品種、日本晴の出穂前の穂を採取し、10℃の温度で、10日間の低温処理

を行った後、1%次亜塩素酸ナトリウム溶液で1分間の殺菌、滅菌水で洗浄し、  
顕花から、葯を摘出し、50個の葯を3ml液体培地の入った35×10mmのシャー  
レ (CORNING 社) 内に置床し、30℃の温度、24時間明所で誘導培養した。1L  
の培地中に、4gのCHU(N6) Basal Salt Mixture (siguma 社)、1ml MS  
5 vitamin solution (siguma 社)、2mg/l 2,4-Dichloro-phenoxyacetic  
acid (siguma 社)、30g sucrose (WAKO) を含む液体培地を使用した。誘導  
培養3~4週間目に、誘導された葯由来カルスは、20-30ml 培地の入った90×  
20mmのシャーレ (iwaki 社) 内に移植し、30℃の温度、24時間明所で増殖培  
養した。1Lの培地中に、4gのCHU(N6) Basal Salt Mixture (siguma 社)、  
10 1ml MS vitamin solution (siguma 社)、2ml α-Naphthalene Acetic Acid  
solution (siguma 社)、2ml kinetin solution (siguma 社)、3g casamino  
acids (DIFCO)、30g sucrose (WAKO)、2g gelrite (WAKO) を含む固体  
培地を使用した。それぞれ増殖培養2週間目の葯由来カルスより、既報 (Kikuchi  
et al. (1998) Plant Biotechnology 15: 45-48) に記載の方法に従い、  
15 DNAを抽出した。

イネ品種、日本晴の種子を、3%次亜塩素酸ナトリウム溶液で15~30分間の  
殺菌、滅菌水で洗浄し、9個の種子を20-30ml 培地の入った90×20mmのシャ  
ーレ (iwaki) 内に置床し、30℃の温度、24時間明所で誘導培養した。1Lの培  
地中に、4gのCHU(N6) Basal Salt Mixture (siguma)、1ml MS vitamin  
20 solution (siguma)、2mg/l 2,4-Dichloro-phenoxyacetic acid (siguma)、  
0.3g casamino acids (DIFCO)、0.1g myo-inositol (siguma)、2.878g  
proline (WAKO)、30g sucrose (WAKO)、2g gelrite (WAKO) を含む固体  
培地を使用した。誘導培養10日目に、誘導された種子由来カルスは、5-アザ  
シチジン (siguma) を0mM、0.1mM 0.5mMの濃度で含む増殖培地に移植し、  
25 30℃の温度、24時間明所で増殖培養した。1Lの培地中に、4gのCHU(N6) Basal  
Salt Mixture (siguma)、1ml MS vitamin solution (siguma)、2mg/l  
2,4-Dichloro-phenoxyacetic acid (siguma)、0.3g casamino acids  
(DIFCO)、0.1g myo-inositol (siguma)、2.878g proline (WAKO)、30g  
sucrose (WAKO)、2g gelrite (WAKO) を含む固体培地を使用した。増殖培

養2週間目の種子由来カルスより、Dneasy plant mini kit (QIAGEN) により DNA を抽出した。

トランスポゾン DNA を含む領域を PCR 法によって増幅するため、PCR プライマーとして配列番号26と配列番号27の DNA 配列を有するオリゴヌクレオチドを用いた。反応液 100  $\mu$ l 中には、200ng DNA、2.5 units TaKaRa LA Taq (TaKaRa 社)、10  $\mu$ l 10 $\times$ LA PCR BufferII、6  $\mu$ l 25 mM MgCl<sub>2</sub>、8  $\mu$ l dNTP Mixture (2.5mM each dNTP)、100pmol primer が含まれる。PCR の条件は、94℃で30秒間のディネーチャー、68℃で12分間の伸長反応を1サイクルとし、35サイクル反応させた。反応後、0.8% L03 agarose (TaKaRa 社) で分画した。

その結果、薬由来カルス及び胚盤由来カルスにおいては、配列番号3で表される塩基配列を有するトランスポゾンは転移しないが、5-アザシチジンで処理した胚盤由来カルスにおいて高頻度に転移が起こった(表3)。

表3

|                     | 欠失頻度 |         |
|---------------------|------|---------|
| 薬由来カルス(日本晴)         | 0/64 | (0%)    |
| 胚盤由来カルス(日本晴)        | 0/64 | (0%)    |
| 0mM 5-azacytidine   | 0/8  | (0%)    |
| 0.1mM 5-azacytidine | 2/8  | (25%)   |
| 0.5mM 5-azacytidine | 7/8  | (87.5%) |

配列番号3で表される塩基配列を有するトランスポゾンは、構造上、トランスポゼースをコードする自立的トランスポゾン遺伝子であり、5-アザシチジンの処理により活性化し、非自立的トランスポゾン遺伝子(配列番号1)の転移を制御していると考えられる。

#### 実施例10

イネ品種、カサラスの成葉から、Dneasy plant mini kit (QIAGEN) により DNA を抽出した。挿入しているトランスポゾン DNA の隣接領域を PCR によって増幅するため inversePCR 法を用いた。Inverse 用の PCR プライマーとして  
5 CCATTGTGACTGGCC-3') を用いた。PCR には、GeneAmp9600 システム (ABI 社) を使用して行った。PCR 反応液は、HotStarTaq Master Mix kit (QIAGEN) を使用した。PCR の条件は、96℃で 30 秒間のディネーチャー、44~58℃で 1 分間のアニール、72℃で 1 分間の伸長反応を 1 サイクルとし、45 サイクル反応させた。反応後、2% LO3 agarose (TaKaRa) で分画した。増幅された DNA  
10 断片を TA クローニングキット (In Vitrogen) を用いたプラスミド pCRII-TOPO にサブクローニングした。得られたクローンの塩基配列を 310 DNA シーケンサー (ABI 社) を用いて決定した。



## 請 求 の 範 囲

1. 配列番号1で表される塩基配列に少なくとも95%相同のDNAから成るイネのトランスポゾン遺伝子。
- 5 2. エンハンサー又はプロモーターがその内部に挿入された請求項1に記載のトランスポゾン遺伝子。
3. 配列番号2又は配列番号3で表される塩基配列に少なくとも90%相同のDNAから成るイネのトランスポゾン遺伝子。
4. 配列番号2の3190位～4557位の塩基配列又は配列番号3の2959
- 10 位～4407位の塩基配列に少なくとも75%相同のDNAから成るイネのトランスポゼース遺伝子。
5. 配列番号4若しくは配列番号5で表されるアミノ酸配列又はこのアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列から成るタンパク質をコードするトランスポゼース遺伝子。
- 15 6. 配列番号4若しくは配列番号5で表されるアミノ酸配列、又はこのアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列を有するタンパク質から成るトランスポゼース。
7. 請求項1～3のいずれか一項に記載のトランスポゾン遺伝子を含有するプラスミド。
- 20 8. プロモーター及び請求項4又は5に記載のトランスポゼース遺伝子を含有するプラスミド。
9. 請求項1～3のいずれか一項に記載のトランスポゾン遺伝子が導入された形質転換体。
10. 宿主が植物である請求項9に記載の形質転換体。
- 25 11. 前記植物がイネ、オオムギ、コムギ又はトウモロコシである請求項10に記載の形質転換体。
12. プロモーター及び請求項4又は5に記載のトランスポゼース遺伝子が導入された形質転換体。
13. 宿主が植物である請求項12に記載の形質転換体。

14. 前記植物がオオムギ、コムギ又はトウモロコシである請求項13に記載の形質転換体。
15. 請求項9～14のいずれか一項に記載の形質転換体を薬培養又は薬剤で処理することにより請求項1～3のいずれか一項に記載のトランスポゾン遺伝子を
- 5 転移させる方法。
16. 前記薬剤が5-アザシチジン又は5-アザデオキシシチジンである請求項15に記載の方法。
17. イネを薬培養、又はイネの種子、葉、根、茎若しくは腋芽、又はそれに由来のカルスを5-アザシチジン若しくは5-アザデオキシシチジンで処理して培
- 10 養することにより請求項1に記載のトランスポゾン遺伝子を転移させる方法。
18. 請求項15～17のいずれか一項に記載の方法により、前記トランスポゾン遺伝子が転移して形質転換した植物又はその種。
19. 前記植物がイネ、オオムギ、コムギ又はトウモロコシである請求項18に記載の植物又はその種。
- 15 20. 請求項15～17のいずれか一項に記載の方法により請求項1～3のいずれか一項に記載のトランスポゾン遺伝子を移転させる段階、前段階で得た植物からDNAを抽出する段階、該DNAをトランスポゾン遺伝子内にカッティングサイトの
- 20 ない制限酵素で消化する段階、前段階で得たDNA断片をライゲーションする段階、前段階で得たDNA断片をPCRを行う段階、得られたPCR産物の塩基配列を決定する段階から成る方法であって、該PCRを行うために用いるプライマーとして、配列番号1で表される塩基配列の5'末端から少なくとも10塩基のオリゴヌクレオチド及び配列番号1で表される塩基配列の3'末端から少なくとも10塩基のオリゴヌクレオチド又はこれらに相補的なオリゴヌクレオチドを用いるトランスポゾン遺伝子の挿入領域を特定する方法。

1/11

## 第 1 図

|             |            |             |             |            |            |
|-------------|------------|-------------|-------------|------------|------------|
| 144010      | 144020     | 144030      | 144040      | 144050     | 144060     |
| TTTCAAGTAC  | AATCTCAACT | TAGGGAAAAGT | TGTGATTGAG  | GGAGGATGTT | AGATAATGTT |
| 144070      | 144080     | 144090      | 144100      | 144110     | 144120     |
| AGTTAGTTTG  | TTATAGAGAT | AGATTAGTTC  | TGTTACCGCA  | TGTACTTTCT | TGTATCTATC |
| 144130      | 144140     | 144150      | 144160      | 144170     | 144180     |
| TCTATATCCA  | GGATTGCTC  | AGGTTGTGTA  | GATTAATCCT  | ATCCTTTGTA | CACGCCACGG |
| 144190      | 144200     | 144210      | 144220      | 144230     | 144240     |
| TAGAGGCTCT  | TTCTGCCAT  | ATCAACAAAG  | GTGCGGCCCC  | GTAAAGGGGT | TCAACGCTTC |
| 144250      | 144260     | 144270      | 144280      | 144290     | 144300     |
| TCATTCCGTT  | TTACAATCCT | CCTTCTTCCT  | CCTGGTGTG   | GAAATTCGTT | GATCGAGTTG |
| 144310      | 144320     | 144330      | 144340      | 144350     | 144360     |
| AAACTCTCAT  | CCTTCATCAT | GTGCTGCAGA  | AACTAACGCG  | TGCACAGATG | ATGGATGGGT |
| 144370      | 144380     | 144390      | 144400      | 144410     | 144420     |
| GTGGTGTGAC  | ATGAAAGTGG | ATCAATGACA  | CGCGGCACAT  | TTAGGGGAGT | GTGTCGTGTC |
| 144430      | 144440     | 144450      | 144460      | 144470     | 144480     |
| TTGACTTCTT  | CATGCAAAAG | TATACCAACC  | CTGTATAAGG  | CCAGTCACAA | TGGCTAGTGT |
| 144490      | 144500     | 144510      | 144520      | 144530     | 144540     |
| CATTGCACGG  | CTACCCAAAA | TATTATACCA  | TCCTCTCTCA  | AATGAAATCT | TTTATGAAAC |
| 144550      | 144560     | 144570      | 144580      | 144590     | 144600     |
| AAATCCCAACA | GTGGAGGGGT | TTCACTTTGA  | CGTTTCCAAG  | ACTAAGCAAA | GCATTTAATT |
| 144610      | 144620     | 144630      | 144640      | 144650     | 144660     |
| GATACAAGTT  | GCTGGGATCA | TTTGTACCCA  | AAATCCGGCG  | CGGCGCGGGA | GAATGCGGAG |
| 144670      | 144680     | 144690      | 144700      | 144710     | 144720     |
| GTOGCACGGC  | GGAGGCGGAC | GCAAGAGATC  | CGGTGAATGA  | AACGAATCGG | CCTCAACGGG |
| 144730      | 144740     | 144750      | 144760      | 144770     | 144780     |
| GGTTTCACTC  | TGTTACCGAG | GACTTGGAAA  | CGACGCTGAC  | GAGTTTCACC | AGGATGAAAC |
| 144790      | 144800     | 144810      | 144820      | 144830     | 144840     |
| TCCTTCCTTC  | TCTCTCATCC | CCATTTTCATG | CAAATAATCA  | TTTTTTATTC | AGTCTTACCC |
| 144850      | 144860     | 144870      | 144880      | 144890     | 144900     |
| CTATTAAATG  | TGCATGACAC | ACCACTGAAA  | CCCCCATTTGT | GACTGGCCTA | AGCATCTTTG |

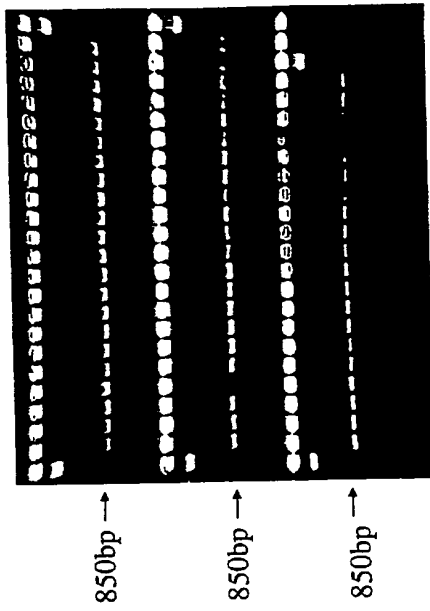
3' LTR

逆向き  
反復配列

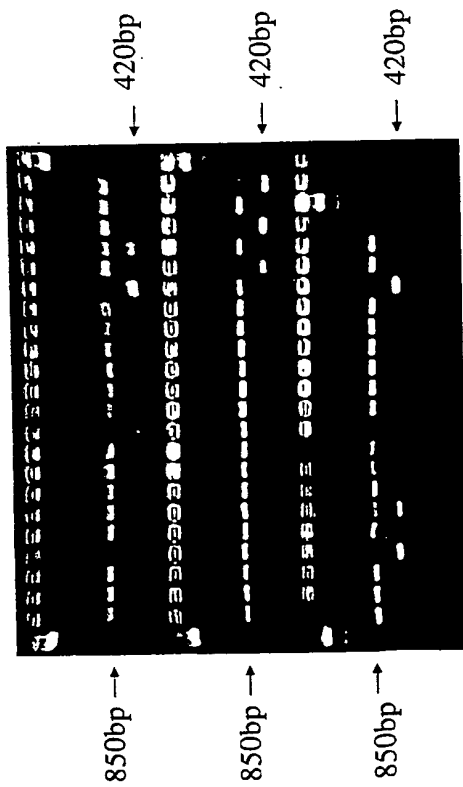
## 第 2 図



第 3 図

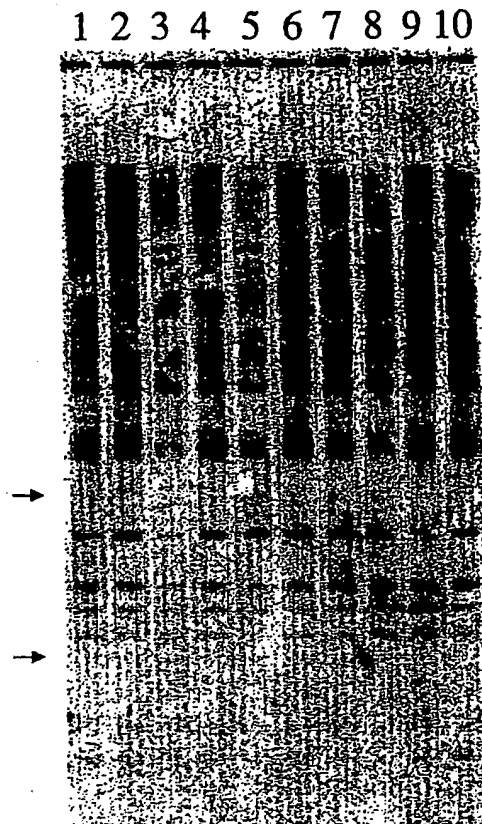


第 4 図



3/11

第 5 図

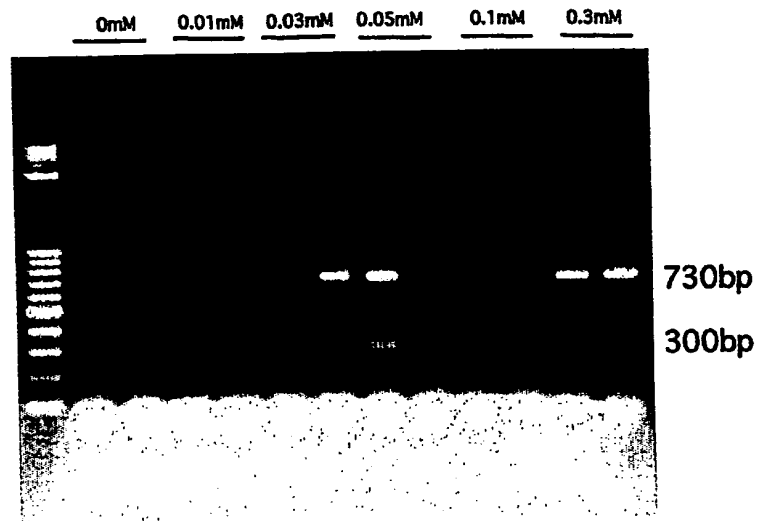


第 6 図



4/11

第 7 図



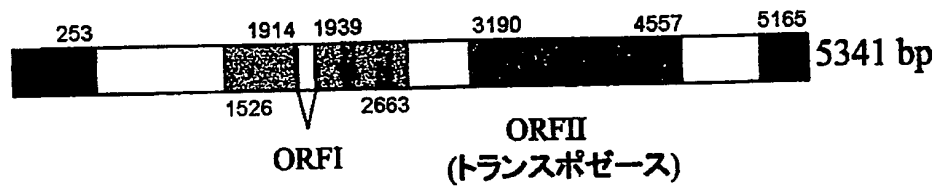
5/11

## 第 8 図

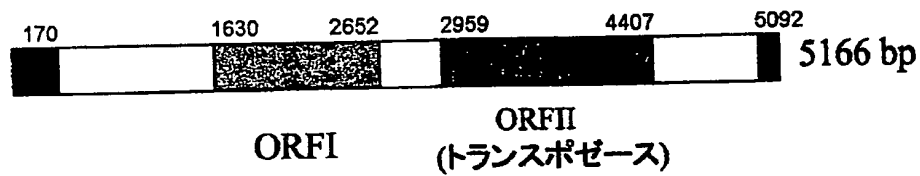
|              |            |            |            |            |            |
|--------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| L05          | ATGTAGTTTG | TCGGTAAGTT | TGATTATCAC | GGTAACCACA | AGTCAAGGGA |
| AzaC-callus1 | ATGTAGTTTG | TCGGTAAGTT | TGATTATCAC | GGTAACCACA | AGTCAAGGGA |
| AzaC-callus2 | ATGTAGTTTG | TCGGTAAGTT | TGATTATCAC | GGTAACCACA | AGTCAAGGGA |
| AzaC-callus3 | ATGTAGTTTG | TCGGTAAGTT | TGATTATCAC | GGTAACCACA | -----      |
| AzaC-callus4 | ATGTAGTTTG | TCGGTAAGTT | TGATTATCaC | GGTAAC---- | -----      |
| L05          | AAGATATGGA | CTCCTTAATA | AGGCCAGTCA | CAATGGGGGT | TTCACTGGTG |
| AzaC-callus1 | AAGATATGGA | CTCCTTAA-- | -----      | -----      | -----      |
| AzaC-callus2 | AAGATATGGA | CTCCTTAATA | A-----     | -----      | -----      |
| AzaC-callus3 | -----      | -----      | -----      | -----      | -----      |
| AzaC-callus4 | -----      | -----      | -----      | -----      | -----      |
| L05          | TGTCATGCAC | ATTTAATAGG | GGTAAGACTG | AATAAAAAAT | GATTATTTGC |
| AzaC-callus1 | -----      | -----      | -----      | -----      | -----      |
| AzaC-callus2 | -----      | -----      | -----      | -----      | -----      |
| AzaC-callus3 | -----      | -----      | -----      | -----      | -----      |
| AzaC-callus4 | -----      | -----      | -----      | -----      | -----      |
| L05          | ATGAAATGGG | GATGAGAGAG | AAGGAAAGAG | TTTCATCCTG | GTGAAACTCG |
| AzaC-callus1 | -----      | -----      | -----      | -----      | -----      |
| AzaC-callus2 | -----      | -----      | -----      | -----      | -----      |
| AzaC-callus3 | -----      | -----      | -----      | -----      | -----      |
| AzaC-callus4 | -----      | -----      | -----      | -----      | -----      |
| L05          | TCAGCGTCGT | TTCCAAGTCC | TCGGTAACAG | AGTGAAACCC | CCGTTGAGGC |
| AzaC-callus1 | -----      | -----      | -----      | -----      | -----      |
| AzaC-callus2 | -----      | -----      | -----      | -----      | -----      |
| AzaC-callus3 | -----      | -----      | -----      | -----      | -----      |
| AzaC-callus4 | -----      | -----      | -----      | -----      | -----      |
| L05          | CGATTCTGTT | CATTCAACCG | ATCTCTTGCG | TCCGCCTCCG | CCGTGCGACC |
| AzaC-callus1 | -----      | -----      | -----      | -----      | -----      |
| AzaC-callus2 | -----      | -----      | -----      | -----      | -----      |
| AzaC-callus3 | -----      | -----      | -----      | -----      | -----      |
| AzaC-callus4 | -----      | -----      | -----      | -----      | -----      |
| L05          | TCCGCATTCT | CCCGCGCCGC | GCCGGATTTT | GGGTACAAAT | GATCCCAGCA |
| AzaC-callus1 | -----      | -----      | -----      | -----      | -----      |
| AzaC-callus2 | -----      | -----      | -----      | -----      | -----      |
| AzaC-callus3 | -----      | -----      | -----      | -----      | -----      |
| AzaC-callus4 | -----      | -----      | -----      | -----      | -----      |
| L05          | ACTTGATCA  | ATTAAATGCT | TTGCTTAGTC | TTGGAAACGT | CAAAGTGAAA |
| AzaC-callus1 | -----      | -----      | -----      | -----      | -----      |
| AzaC-callus2 | -----      | -----      | -----      | -----      | -----      |
| AzaC-callus3 | -----      | -----      | -----      | -----      | -----      |
| AzaC-callus4 | -----      | -----      | -----      | -----      | -----      |
| L05          | CCCCTCCACT | GTGGGGATTG | TTTCATAAAA | GATTTTCATT | GAGAGAAGAT |
| AzaC-callus1 | -----      | -----      | -----      | -----      | -----      |
| AzaC-callus2 | -----      | -----      | -----      | -----      | -----      |
| AzaC-callus3 | -----      | -----      | -----      | -----      | -----      |
| AzaC-callus4 | -----      | -----      | -----      | -----      | -----      |
| L05          | GGTATAATAT | TTTGGGTAGC | CGTGCAATGA | CACTAGCCAT | TGTGACTGGC |
| AzaC-callus1 | -----      | -----      | -----      | -----      | -----      |
| AzaC-callus2 | -----      | -----      | -----      | -----      | -----      |
| AzaC-callus3 | -----      | -----      | -----      | -----      | -----      |
| AzaC-callus4 | -----      | -----      | -----      | -----      | -----      |
| L05          | CTAACACTGA | ACTGATCAAA | GAGCATTTAT | TATGGAAAGA | TGATTGTGTC |
| AzaC-callus1 | ----CACTGA | ACTGATCAAA | GAGCATTTAT | TATGGAAAGA | TGATTGTGTC |
| AzaC-callus2 | ----CACTGA | ACTGATCAAA | GAGCATTTAT | TATGGAAAGA | TGATTGTGTC |
| AzaC-callus3 | -----CTGA  | ACTGATCAAA | GAGCATTTAT | TATGGAAAGA | TGATTGTGTC |
| AzaC-callus4 | -----ACTGA | ACTGATCAAA | GAGCATTTAT | TATGGAAAGA | TGATTGTGTC |

第 9 図

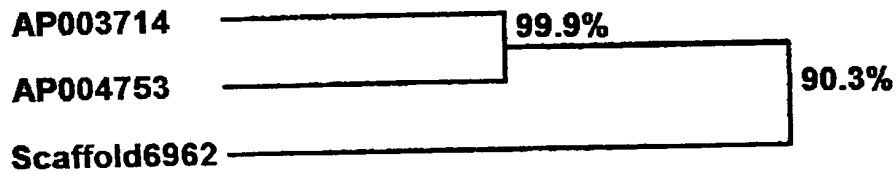
配列番号 2



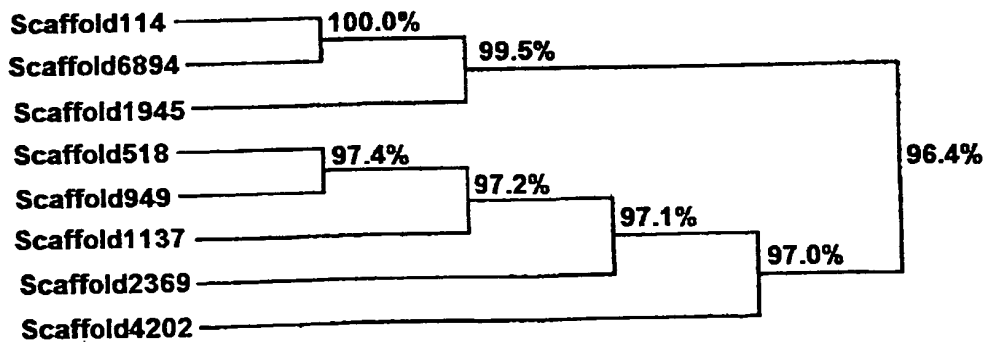
配列番号 3



第 10 図



第 11 図





7/11

第 1 2 図

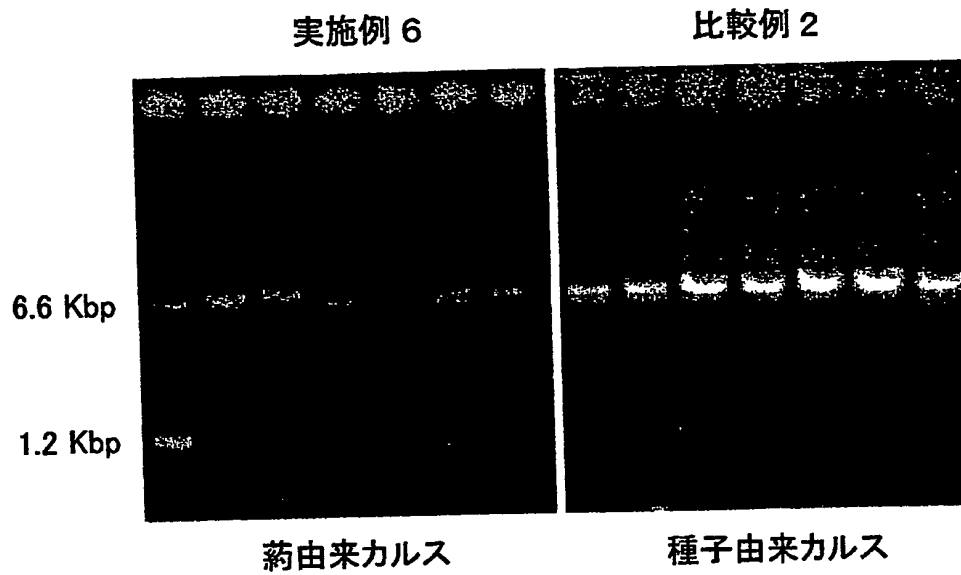
```

MS GNENQIPVSL
MQSLAISLLL SETHSLFSHT KTSSLLSLLF LSSSKMSEQN TDGSQVPVNL
      * * * *
LDEFLAEDEI MDEIMDDVLH EMMVLLQSSI GDLEREAADH RLHPRKHIKR
LDEFLAEDEI ID----DLLT EATVVVQSTI EGLQNEASDH RHHPRKHIKR
***** * * * * * * * * * * * * * * * *
PREEAHQNLV NDYFSENPLY PSNIFRRRFR MYRPLFLRIV DALGQWSDYF
PREEAHQQLV NDYFSENPLY PSKIFRRRFR MSRPLFLRIV EALGQWSVYF
***** * * * * * * * * * * * * * * * *
TORVDAAGRO GLSPLQKCTA AIRQLATGSG ADELDEYLKI GETTAMDAMK
TORVDAVNRK GLSPLQKCTA AIRQLATGSG ADELDEYLKI GETTAMEAMK
***** * * * * * * * * * * * * * * * *
NFVKGIREVF GERYLRRPTV EDTERLLELG ERRGFPGMFG SIDCMHWQWE
NFVKGQLQDVF GERYLRRPTM EDTERLLQLG EKRGFPGMFG SIDCMHWHWE
***** * * * * * * * * * * * * * * * *
RCPTAWKGQF TRGDQKVPTL ILEAVASHDL WIWHAFFGVA GSNNDINVLS
RCFVAWKGQF TRGDQKVPTL ILEAVASHDL WIWHAFFGAA GSNNDINVLN
***** * * * * * * * * * * * * * * * *
RSTVFINELK GOAPRVQYMV NGNQYNEGYF LADGIYPEWK VFAKSYRLPI
QSTVFIKELK GOAPRVQYMV NGNQYNTGYF LADGIYPEWA VFKSIRLPN
***** * * * * * * * * * * * * * * * *
DXG/AF/F motif
TEKEKLYAQH QEGARKDIER AFGVLQRRFC ILKRPARLYD RGVLRDVVLG
TEKEKLYADM QEGARKDIER AFGVLQRRFC ILKRPARLYD RGVLRDVVLA
***** * * * * * * * * * * * * * * * *
YREK motif
CIILHNMIVE DEKEARLIEE NLDLNEPASS STVOAPEFSP DQHVPLERIL
CIILHNMIVE DEKETRIIEE DLDLNVPPSS STVQEPFSP EQNTPFDRVL
***** * * * * * * * * * * * * * * * *
EKDTSMRDRL AHRRLKNDLV EHIWNKFGGG AHSSGNYVFI LHY
EKDISIRDRA AHNRLKKDLV EHIWNKFGGA AHRTGN
*** * * * * * * * * * * * * * * * *

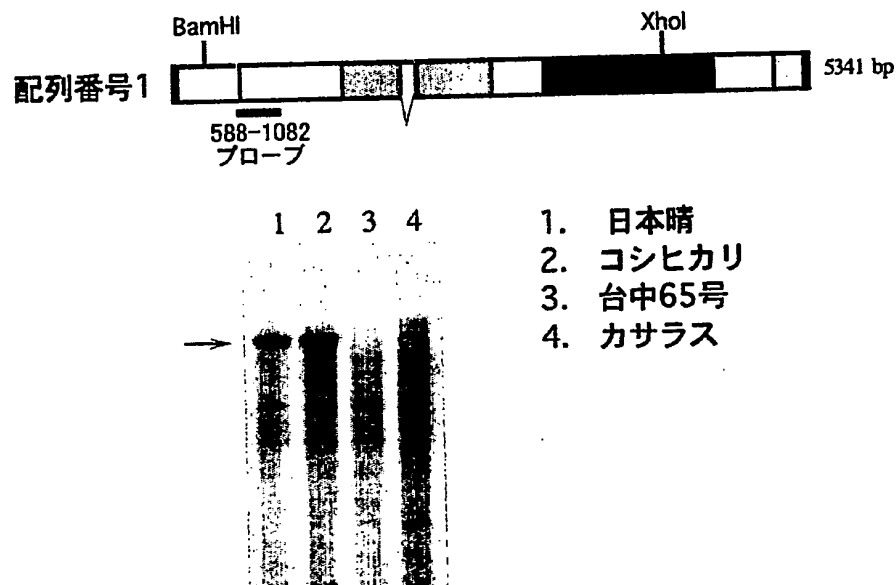
```

8/11

第 1 3 図

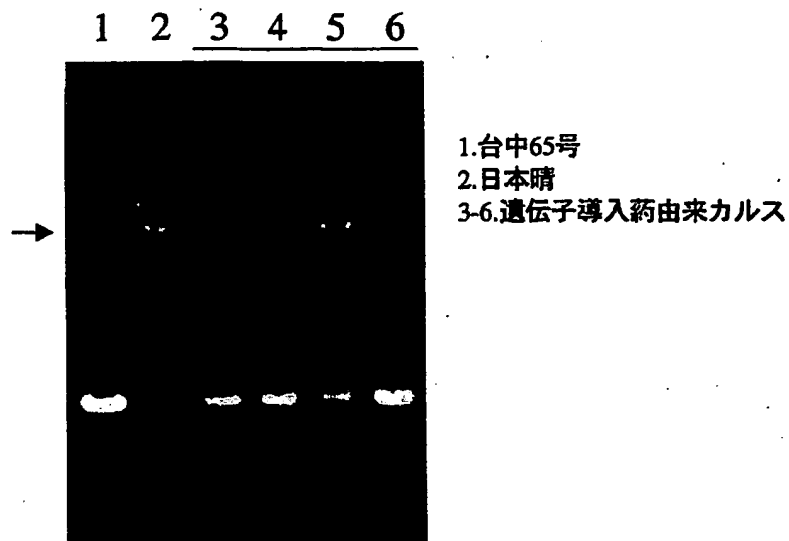


第 1 4 図

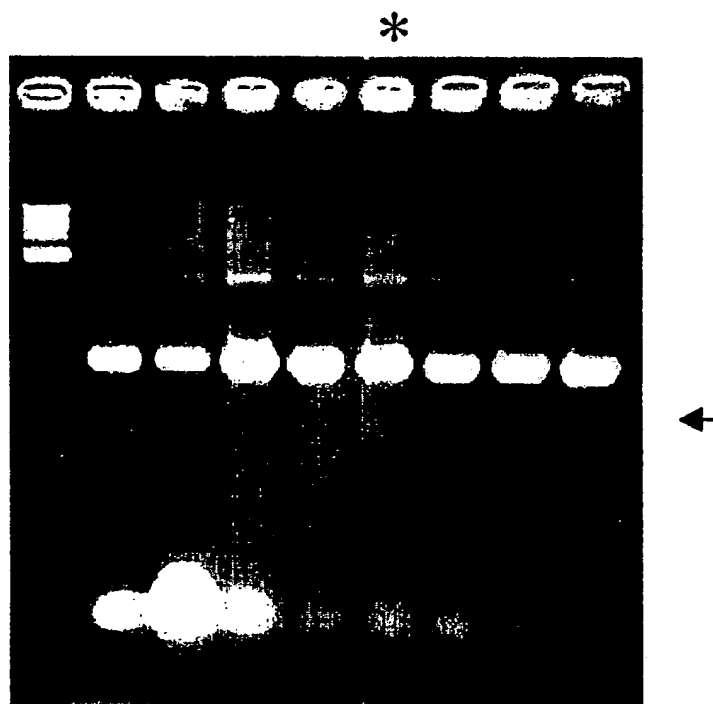


9/11

第 1 5 図



第 1 6 図



10/11

第 17 図

L02 GCGTGGACAC ACTGATTGGC CTGACAAAAC ATAGTTAGCA ATTTGCATTA  
Seq GCGTGGACAC ACTGATTGGC CTGACAAAAC ATAGTTAGCA ATT——

L02 GGCCAGTCAC AATGGCTAGT GTCATTGCAC GGCTACCCAA AATATTATAC  
Seq —————

L02 CATCTTCTCT CAAATGAAAT CTTTTATGAA ACAATCCCCA CAGTGGAGGG  
Seq —————

L02 GTTCACTTT GACGTTTCCA AGACTAAGCA AAGCATTTAA TTGATACAAG  
Seq —————

L02 TTGCTGGGAT CATTGTACC CAAAATCCGG CGCGGCGCGG GAGAATGCGG  
Seq —————

L02 AGGTCGCACG GCGGAGGCGG ACGCAAGAGA TCCGGTGAAT GAAACGAATC  
Seq —————

L02 GGCCTCAACG GGGGTTTCAC TCTGTTACCG AGGACTTGA AACGACGCTG  
Seq —————

L02 ACGAGTTTCA CCAGGATGAA ACTCTTTCCT TCTCTCTCAT CCCCATTTC  
Seq —————

L02 TGCAAATAAT CATTTTTAT TCAGTCTTAC CCCTATTAAA TGTGCATGAC  
Seq —————

L02 ACACCAGTGA AACCCCCATT GTGACTGGCC TTACGGCAAC ATTTGGATAT  
Seq —————

L02 CGAATTATGT CCAAAGAGCG AAGGTATCTG TTAGCTAATC ATCCGATCGG  
Seq —ATGT CCAAAGAGCG AAGGTATCTG TTAGCTAATC ATCCGATCGG

11/11

第 18 図

L06 TGGTCCTCGA TACTGTTGCC TGTTGGTACG GCACCACACC ACTCTGTTT  
Seq TGGTCCTCGA TACTGTTGCC TGTTGGTACG GCACCACACC ACTCTGTTT

L06 TATTAGGCCA GTCACAATGG CTAGTGTCTAT TGCACGGCTA CCCAAAATAT  
Seq TATTAG-----

L06 TATACCATCT TCTCTCAAAT GAAATCTTTT ATGAAACAAT CCCACAGTG  
Seq -----

L06 GAGGGGTTTC ACTTTGACGT TTCCAAGACT AAGCAAAGCA TTTAATTGAT  
Seq -----

L06 ACAAGTTGCT GGGATCATTT GTACCCAAAA TCCGGCGCGG CGCGGGAGAA  
Seq -----

L06 TCGGGAGGTC GCACGGCGGA GGCGGACGCA AGAGATCCGG TGAATGAAAC  
Seq -----

L06 GAATCGGCCT CAACGGGGGT TTCACTCTGT TACCGAGGAC TTGAAACGA  
Seq -----

L06 CGCTGACGAG TTCACCAGG ATGAAACTCT TTCCTTCTCT CTCATCCCCA  
Seq -----

L06 TTTCATGCAA ATAATCATTT TTTATTCAGT CTTACCCCTA TTAAATGTGC  
Seq -----

L06 ATGACACACC AGTGAAACCC CCATTGTGAC TGGCCTTAGA GGTAAGTTTG  
Seq -----A GGTAAGTTTG

L06 ATAGTACAGC CCACTACCAG CTCTAAATCA GTCAATGTAG TAGCTAATTC  
Seq ATAGTACAGC CCACTACCAG CTCTAAATCA GTCAATGTAG TAGCTAATTC

## SEQUENCE LISTING

&lt;110&gt; Japan Science and Technology Corporation

&lt;120&gt; イネのトランスポゾン遺伝子

&lt;130&gt; FS02-290PCT

5 &lt;160&gt; 27

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 430

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Oryza sativa

10 &lt;400&gt; 1

ggccagtcac aatgggggtt tcactggtgt gtcatgcaca tttaataggg gtaagactga 60  
ataaaaaatg attatttgca tgaaatgggg atgagagaga aggaaagagt ttcattcctgg 120  
tgaaactcgt cagcgtcgtt tccaagtcct cggtaacaga gtgaaacccc cgttgaggcc 180  
gattcgtttc attcaccgga tctcttgctt ccgcctccgc cgtgcgacct ccgcattctc 240  
15 ccgcgccgcg ccggattttg ggtacaaatg atcccagcaa cttgtatcaa ttaaagtctt 300  
tgcttagtct tggaaacgtc aaagtgaac ccctccactg tggggattgt ttcataaaag 360  
atttcatttg agagaagatg gtataatatt ttgggtagcc gtgcaatgac actagccatt 420  
gtgactggcc 430

&lt;210&gt; 2

20 &lt;211&gt; 5341

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Oryza sativa

&lt;400&gt; 2

ggccagtcac aatggaggtt tcactggtgt gtcatgcaca tttaataggg gtaagactga 60  
25 ataaaaaatg attatttgca tgaaatgggg atgagagaga aggaaagagt ttcattcctgg 120  
tgaaactcgt cagcgtcgtt tccaagtcct cggtaacaga gtgaaacccc cgttgaggcc 180  
gattcgtttc attcaccgga tctcttgctt ccgcctccgc cgtgcgacct ccgcattctc 240  
ccgcgccgcg ccgcgccacg cctccttccc gcgtgaacat tcctccttcc ccgcgcgagcg 300  
attccaccat ctccccgtc cggcgcctac ggagtacacc gcaaccggtc gcccacatcc 360

ggcgccctaga ccgtgaccca cccgccatct tccgcaagac cgaatcccca acccaccac 420  
catcttccgc cgccccgc cccgtccccg gccatggatc cgtcgccggc cgtggatccg 480  
tcgccggccg tggatccgtc gccggctgct gaaaccggc ggcggtcaac cgggaaagga 540  
ggcaaacagc gcgggggcaa gcaactagga ttgaagaggc gcccgccgat ttctgtccc 600  
5 gccacccgc ctctgtctg gacgtcttca tcccctgtg gcccgacgc catcccacca 660  
cgaccaccgc aatcttcgcc gattttctgc cccgattcgc cgaatccgtc accggctgcg 720  
ccgacctcct ctcttgcttc ggggacatcg acggcaaggc caccgcaacc acaaggagga 780  
ggatggggac caacatcgac catttcccca aactttgcat ctttctttgg aaaccaacaa 840  
gacccaaatt catggtacat gtattttctt cttttctgt tactttcaac ctacggtaac 900  
10 tctaattcat ggatgagact actgccattg tgcagtcaa tgcttttct tcatgttata 960  
tttctccag ctgtgagtta tggttgaag attgctgtgg ttgtttcatt gctgagtatg 1020  
tgaaagatag atggatgaaa gagagaatta tattttagtc tgtaatcttg ctcatccagt 1080  
tgctcatgta tgaccttgg tctagaatgt tgccctgact gtatgcttaa tgttcagaga 1140  
agtgatgcct aaagcagtga gatcagtggt atcagattag ctatcgacat ataattattg 1200  
15 ctatctcagt tgtgaaagag agatgggtga aaaggcacc cttggattaa ttctgtagta 1260  
tcaaattctg caccttgtct gtccatatgt tctgcttgg tgggggtgc agtgcatctg 1320  
taaaaaatag tttgcttctg atccttaata tatgtaacag ggaatgaatt ttcacccatc 1380  
tcagttgtaa aggtactgtc ttgctatgca atatgtgtaa attgacaaac ctgaaaatag 1440  
tctgtttgga atttgcaaaa gcaattcgat agtttggaat ttccaaacct cagtcagcag 1500  
20 taggcaatcc attttagttc ttgctatgca caaaaacagt acacctgata tgctcatttt 1560  
aatacaactt tttgtctct gttacagttt ggtcaggggt tatcctccag gagggttgt 1620  
caattttatt caacaaaatt gtccgccgca gccacaacag caagggtgaa attttcattt 1680  
cgttggtcac aatatgggat tcaacccaat atctccacag ccaccaagt cctacggaac 1740  
accaacaccc caagctacga accaaggcac ttcaacaaac attatgattg atgaagagga 1800  
25 caacaatgat gacagtaggg cagcaaagaa aagatggact catgaagagg aagagagact 1860  
ggtattcatc ggatactttt acatttccat atgtctttgt ttgactaat acttgacagg 1920  
tcattaactg attctttag gccagtgtt ggttgatgc ttctaaagac tcaattcatg 1980  
ggaatgataa gaaagtgat acattttgga aggaagtcac tgatgaattt aacaagaaag 2040  
ggaatggaaa acgtaggagg gaaattaacc aactgaagg tcaactgtca aggttgaagt 2100

cagcgatctc tgagttcaat gactattgga gtacggttac tcaaatgcat acaagcggat 2160  
actccgacga catgcttgag aaagaggcac agaggctgta tgcaaacagg tttggaaaac 2220  
cttttgcgtt ggtccattgg tggaagatac tcaaatgta gcccaaatgg tgtgctcagt 2280  
ttgaatcaga gaaagacaag agcgaaatgg atgctgttcc agaacagcag tcacgtccta 2340  
5 ttggtagaga agcagcaaag tctgagcgca atggaaagcg caagaaagaa aatgttatgg 2400  
aaggcattgt cctcctaggg gacaatgtcc agaaaattat aaaggtccac gaagaccgga 2460  
gggtggatcg tgaaaaggcc accgaagcac agattcagat atcaaatgca acattgttgg 2520  
ccgctaagga gcagaaggaa gcaaagatgt tcgatgtgta caatactcta ttaagtaagg 2580  
atacaagcaa catgtctgaa gatcaaatgg ctagccacca gagggcaata cggaaattag 2640  
10 aggagaagct atttgcggat taaggtgagt ttataaaact gaccactatt ttctgaaatg 2700  
tatgaattct gaaatttata tacaattgtg taaacatgga aaattagata atgtatgcat 2760  
gatgcacaac atgtgcgtgc agcactatct aatggcagtt tcacaagtgt gaaaactgac 2820  
cactatagta ctattgtggt gtgaaaactg accactacta ttgtggtgtg aatgctactg 2880  
tggtgtgaaa actgaccact atagtttcac attcctggat gcagccctcc tctatatata 2940  
15 tagatacagt cctcatctct tcttggcata cacacagccc tcttctctaa ttcttggacg 3000  
cagtctcat ctcttcttgg catagacgca gcccttctct cttctgttt agttcaacaa 3060  
cattgagggtg atctgccttt ctttgaagtt tctatctttt ttactgctg tgaatgatta 3120  
tttctctgct gtgaatgatt atttctccaa tcttctttg ttaccttct ctctttctct 3180  
gctgtgaaga tgtctggaaa tgaaaatcag attcctgtgt ccttgttga cgagtttctc 3240  
20 gctgaggatg agatcatgga tgagataatg gatgatgttc tccatgaaat gatggtgtta 3300  
ttgcagtcct ccatcgga tcttgaaaga gaggtgctg accatcgttt gcatccaagg 3360  
aagcacatca agaggccacg agaggaagca catcaaaatt tggatgaatga ttatttctct 3420  
gaaaatcctc tatatccttc caatattttt cgccgaagat ttcgtatgta caggccgctg 3480  
tttttacgta ttgtggacgc attaggccag tggtcagatt actttactca gagggtagat 3540  
25 gccgttgta ggcaagggt tagtccatta caaaagtga ctgcagcaat tcgccaattg 3600  
gctactggta gtggtgctga tgaactagat gaggatttga agattggaga gactactgct 3660  
atggatgcta tgaaaaattt tgtgaaagga attagagaag tatttgggtga aagatatctc 3720  
aggcgtccca ctgtagaaga tactgaacga ctactcgagc ttggtgagag acgcggtttt 3780  
cctggtatgt tcggtagcat tgactgtatg cattggcaat gggaagggtg cccaactgcg 3840



tggaagggtc agttcactcg tggatgatcaa aaagtgccaa cgctgattct tgaggcagtg 3900  
gcatcacatg atctttggat ttggcatgcg ttctttggag tagcaggttc taacaatgat 3960  
atcaatgttt tgagccgacg tactgtgttt atcaatgagc tgaaaggaca agctcctaga 4020  
gtgcagtaca tggtaaattg gaatcaatac aacgaaggtt attttcttgc tgatggaatt 4080  
5 taccctgaat ggaaggtatt tgctaagtca tatcgactcc ctatcactga gaaggagaag 4140  
ttgtatgcac aacatcaaga aggggcaaga aaggatatcg agagagcatt tgggtgttcta 4200  
caacgtcgat tctgcatctt aaaacgacca gcccgctctat atgaccgagg tgtactccgt 4260  
gatgttgtcc taggttgcac catacttcac aatatgatag ttgaagatga gaaggaagcg 4320  
cgacttattg aagaaaatct agatttaaag gagcctgcta gttcatcaac gggttcaggca 4380  
10 ccagaattct ctctgacca gcatgttcca ttagaaagaa ttttagaaaa ggatactagt 4440  
atgagagatc gtttggctca tcgccgactc aagaatgatt tgggtgaaca tatatggaat 4500  
aagtttggtg gtggtgcaca ttcactctgtt aattatgttt ttattttgca ttattagtta 4560  
tctatggtac taagatatgt acaagtttct ctaaattgca ctaaactctgt gggtcatatt 4620  
ggatatgtgt aaactatgaa ttagcctga ctaaaaccat cattcatgct gaactgggtt 4680  
15 ttgttttgta tatgcaggat gaaacaagga actaggttct tgaacgcatt acggactgaa 4740  
gggtgagggg cagaatgatc caccagttg cttctatcag atcactaaag tttcatttca 4800  
ctgttttatt ttggacactt gatgcttggt tgcacccgat gaatgtttaa tttggtcacc 4860  
tgatgcttgt gtgcatccga tgaatgttta atttggtcac ctgatgcttg tatgcagtta 4920  
tctatcttat ttgttaattg tgctggtact gaggattttt agaagtgaag tgcacaagtt 4980  
20 gctgtgtttt ttgactgatc cttgtgtgca cttgacgttg tatgtgaca atgatggttc 5040  
ccagttgtgc acctgattca tgattcagtt attcagttta aattgacgtt gtttgtgtgc 5100  
accttttgc agttagccag ttacggctgg aagttgtgta agtttgtgtg acgcctggct 5160  
acaggatttt ggtacaaat gatccagca acttgatatca attaaatgct ttgcttagtc 5220  
ttggaaacgt caaagtgaag cccctccact gtggggattg tttcataaaa gatttcattt 5280  
25 gagagaagat ggtataatat tttgggtagc cgtgcaatga cactagccat tgtgactggc 5340  
c 5341

&lt;210&gt; 3

&lt;211&gt; 5166

&lt;212&gt; DNA

<213> *Oryza sativa*

<400> 3

ggccagtcac aatgggtgtt tcatttgagt gtcatgcgca ttaatacag tgacaagtca 60  
gcaaaagagc aatatttgca tgaaatgggt aggagagaga gtaaactcgt ttcacatgg 120  
5 tgacacgaga tagcgccgtt tcccaggctg ctgaaacggg gtgaaacagc attgagagtt 180  
catcgtttca cctccgggat cccgtgcgag cgctgctctt cgccatcttc gcgcgcatcg 240  
ccggattctt cccgcgcgag tccccatct tcccgcgag cacctccatg tcccccccc 300  
caaagcactg gctcgaagct tttttcccca atctcacctg caaccctagc gccagactca 360  
gtccccatcg ccccgctcgt cccataccct agcgcaagaa ccacgagcgg agattgcgga 420  
10 gctggatcca caagtaggtg gtgaatcctg tccatctgcc gccgtccgcc gtccagcagc 480  
catggatcca caaggaggtg gtggatcccg tctgagcgcc gccggcagag gaggaataa 540  
gcgtgggggc aagcagctgg gcctgaagag gtcgtcggcg cctgctccat caccggcaac 600  
agctcagcca ccgctgcctg caagttcccc tcctgaagct ccatcgccgg caacagttca 660  
gccgcctact ccatcgtaaa gtctgtgtgt tgctgcccc agttcatccc ctgtgtacc 720  
15 gatgtcaacc atgcccccat ggccaccgca aggagcagga tggggctctg tccccccaa 780  
ttttgctttt ctgcaaggaa accaacaagg cccaagtcca tggatatttc tccttgtaac 840  
agattattca ctgtacacta tgatacatga tatgactctc ttcttcatgc attagtaatt 900  
agttcctgtt tatgtcaat gaaatttgtt agaatcagta tgtcagtaca ttgtaattt 960  
gatatatgcc tgagtaatga atagaaaaaa ttagttatc agtatggatt gcagtaatac 1020  
20 tttgttagtg aaaattcagt attcagtatg cagtatggat tgcggcttgt ataacagaaa 1080  
ttgaaagcaa aagattcagt ttgcaatctg gacagtgtac tgtacaacat gtaattcaca 1140  
tacgtaaagc ttgttaaata tctccttgta agtacattgg taacaaatgc ttgagtgt 1200  
aatgccaaagg gtatcatcct aacattgta tatattttta gccttctgta tggaatgcag 1260  
acatggtctt ctttgcaacc acagcaacag cttgccctac actctgtgct gtcgtcatag 1320  
25 ctaaccaaat aacctgtag tactgatata tatggtcttc ttgcaacca cagcaacagc 1380  
ttgccctaca tggctctctg tatgcttgac taaacttgtt acttgacata tatgcttgac 1440  
tgaacttgtt gcttgactga attattcctt acacatactg tagtacttgc ttgactgaac 1500  
tatgtcagga tcttattaaa aaaaatctat gtcagcactg ctactatgtc aggatcatca 1560  
gtatgatgct taagtaacct gtagtatgt cagtacttac tatgtcagga tcattctctg 1620

gaacttacta tgtttgattt tcttatgctg ccatcggttt caattggatt tgcttcttat 1680  
gttttcaggt tgtatcctac agaaggcttc gtaaattttc tccaacagaa ctgtctgccg 1740  
cagccacaag aaggtgaaaa ttttcacctt gttggtcaga ctaccaaacac aatgtctact 1800  
ccaccaccaa caccccaagc tgcagctaac aatacagtcc aaattgatat tcatgaagat 1860  
5 gcaatcaatg atgcaagtgc taaaaagaga agtttgagat attggactca tgatgaggaa 1920  
gagagattgg ctagtgcttg gttgaatgct tctaaagatc ccattcatgg gaatgaaaag 1980  
aaaggtgata cgttttggaa agaggttact gatgagttca acagaaaagg gaatgggaag 2040  
cgtacaaggg aaataaatca attgaaggtt cattggtcac gcctcaaate atcgattgga 2100  
gaattcaatg attactggac taaggtaact caaatgaata caagcggata tgacgatgac 2160  
10 atgctggaga aggaggcaca acagatgtat gcaaatacat ttggaaagcc ttttgcaatt 2220  
gtgcattggt ggaagatact gagaaaagag cccaagtggg gtgcaatgat tgagaaggac 2280  
aaaaacaagg ctgaagtggg tgatattcca gatgaacaaa agcgtcccat tggtagagaa 2340  
gcagcacaag ccgagcgcaa tggaaaacgc aagaaggaca gtatgtcaga aggaattgtc 2400  
atcctagggg acaatattga aaaaattatc aaagtgcgc aagatcggaa gctggagcgt 2460  
15 gagaaggtca ctgaagcaca gattcacatt tcaaacgtaa atttgaaggc agcagaacag 2520  
caaaaagaag caaagatggt tgaggatac aattccctgc tactcaaga tacaagtaac 2580  
atgtctgaag aacagaaggc tcgccgagac aaggcattac aaaagctgga ggaaaagtta 2640  
tttctgact aaggttagat atctaattca atctgagctg cactattatt tataataatt 2700  
aaagaatgct gcaatattta gttatattgt ctgtatatct gtgctgcact atgcagtcag 2760  
20 ctgcatatca cgaatttgc aaatctgagc tgcatatctg tgaatggtgc aatatttagt 2820  
tatattaatt acccagtgtg aatgatgtat tgctgtcagt ttcacatata gtatgaatgc 2880  
tgcatatgc agtcagtttc acatgcagtg tgaatgctgc actaggcagt cagtttcaca 2940  
tgcatgggc gcctatttat gcagagtta gccatctctc tactcctctc agaaactcat 3000  
tccctctttt ctcatagaa gacctctcc cttttatctt tactgtttct ctcttcttca 3060  
25 aagatgtctg agcaaaatac tgatggaagt caagttccag tgaacttggt ggatgagttc 3120  
ctggctgagg atgagatcat agatgatctt ctactgaag ccacggtggg agtacagtcc 3180  
actatagaag gtcttcaaaa cgaggcttct gaccatcgac atcatccgag gaagcacatc 3240  
aagaggccac gagaggaagc acatcagcaa ctagtgaatg attacttttc agaaaatcct 3300  
ctttaccctt ccaaaatttt tcgtcgaaga tttcgtatgt ctaggccact ttttcttcgc 3360

atcgttgagg cattaggcca gtgtcagtg tatttcacac aaaggtgga tgctgttaat 3420  
cggaaggac tcagtcact gcaaaagtgt actgcagcta ttcgccagtt ggctactggt 3480  
agtggcgag atgaactaga tgaatatctg aagataggag agactacagc aatggaggca 3540  
atgaagaatt ttgtcaaagg tcttcaagat gtgtttggtg agaggtatct taggcgcccc 3600  
5 accatggaag ataccgaacg gcttctcaa cttggtgaga aacgtggtt tcctggaatg 3660  
ttcggcagca ttgactgcat gcactggcat tgggaaagat gccagtagc atggaagggt 3720  
cagttcactc gtggagatca gaaagtgcc accctgattc ttgaggctgt ggcatgcat 3780  
gatctttgga tttggcatgc attttttga gcagcgggtt ccaacaatga tatcaatgta 3840  
ttgaaccaat ctactgtatt tatcaaggag ctcaaaggac aagctcctag agtccagtag 3900  
10 atggtaaatg ggaatcaata caatactggg tattttcttg ctgatggaat ctacctgaa 3960  
tgggcagtgt ttgttaagtc aatacgactc ccaaacactg aaaaggagaa attgtatgca 4020  
gatatgcaag aaggggcaa gaaaagatgc gagagagcct ttggtgtatt gcagcgaaga 4080  
ttttgcatct taaaacgacc agctcgtcta tatgatcgag gtgtactgcg agatgttggt 4140  
ctagcttgca tcatacttca caatatgata gtgaagatg agaaggaaac cagaattatt 4200  
15 gaagaagatt tagatctaaa tgtgcctcct agttcatcaa ccgttcagga acctgagttc 4260  
tctcctgaac agaacacacc atttgataga gtttagaaa aagatatttc tatccgagat 5320  
cgagcggctc ataaccgact taagaaagat ttggtggaac acatttgga taagtttggt 4380  
ggtgctgcac atagaactgg aaattgagaa tcagtaaag taattatttt atttttcttg 4440  
taatttatat atctatggtc cacttgtaaa tttctgaatg ctcatcgcca tattttttaa 4500  
20 tctctcgagg ttccaatcta ttacaggtt ccctaaaaaa aaatctattt gcaggttcca 4560  
gtctgttgtc ttcacaatgt aagttctgag aatcaaatca ctatgtttt ctcttttttg 4620  
gtagctacag ggtgttagaa catgtgttat tttctttact atgcaattgt gatcctcca 4680  
tatttatcta ctgatgtgt aaacctgttt gtcatgtctg aactactttc attgttacag 4740  
ggtgaaagaa tcaatgaaat ctatgggtgc atcgtcaatt tgcctccagt tacctgctg 4800  
25 tcacgtcat tttagctta gttctgtcat atttcacctc gagttaacat ctattcagtt 4860  
atctaaactt tgctatgtag tgaacttggt tgaatggtca tttaaattta tcaagtgaac 4920  
aatcgtacct atctgtctg aatgcatgta tttgttttg tgttcaagtg gctacacag 4980  
tttgtgttac atacgatccc actatgtggc tggaattaaa tgccttgaat ttgcattgga 5040  
aacgctagag tgaaacacag cattgagaag gtctgtttca ttgtacgttt caacttggtt 5100

catcttcgtt tcagctgatg tggcgtctgg gaaacagtgt aatgaaacac tgcattgtga 5160

atggcc 5166

<210> 4

<211> 455

5 <212> PRT

<213> Oryza sativa

<400> 4

Met Ser Gly Asn Glu Asn Gln Ile Pro Val Ser Leu Leu Asp Glu Phe

1 5 10 15

10 Leu Ala Glu Asp Glu Ile Met Asp Glu Ile Met Asp Asp Val Leu His

20 25 30

Glu Met Met Val Leu Leu Gln Ser Ser Ile Gly Asp Leu Glu Arg Glu

35 40 45

Ala Ala Asp His Arg Leu His Pro Arg Lys His Ile Lys Arg Pro Arg

15 50 55 60

Glu Glu Ala His Gln Asn Leu Val Asn Asp Tyr Phe Ser Glu Asn Pro

65 70 75 80

Leu Tyr Pro Ser Asn Ile Phe Arg Arg Arg Phe Arg Met Tyr Arg Pro

85 90 95

20 Leu Phe Leu Arg Ile Val Asp Ala Leu Gly Gln Trp Ser Asp Tyr Phe

100 105 110

Thr Gln Arg Val Asp Ala Ala Gly Arg Gln Gly Leu Ser Pro Leu Gln

115 120 125

Lys Cys Thr Ala Ala Ile Arg Gln Leu Ala Thr Gly Ser Gly Ala Asp

25 130 135 140

Glu Leu Asp Glu Tyr Leu Lys Ile Gly Glu Thr Thr Ala Met Asp Ala

145 150 155 160

Met Lys Asn Phe Val Lys Gly Ile Arg Glu Val Phe Gly Glu Arg Tyr

165 170 175

Leu Arg Arg Pro Thr Val Glu Asp Thr Glu Arg Leu Leu Glu Leu Gly  
 180 185 190  
 Glu Arg Arg Gly Phe Pro Gly Met Phe Gly Ser Ile Asp Cys Met His  
 195 200 205  
 5 Trp Gln Trp Glu Arg Cys Pro Thr Ala Trp Lys Gly Gln Phe Thr Arg  
 210 215 220  
 Gly Asp Gln Lys Val Pro Thr Leu Ile Leu Glu Ala Val Ala Ser His  
 225 230 235 240  
 Asp Leu Trp Ile Trp His Ala Phe Phe Gly Val Ala Gly Ser Asn Asn  
 10 245 250 255  
 Asp Ile Asn Val Leu Ser Arg Ser Thr Val Phe Ile Asn Glu Leu Lys  
 260 265 270  
 Gly Gln Ala Pro Arg Val Gln Tyr Met Val Asn Gly Asn Gln Tyr Asn  
 275 280 285  
 15 Glu Gly Tyr Phe Leu Ala Asp Gly Ile Tyr Pro Glu Trp Lys Val Phe  
 290 295 300  
 Ala Lys Ser Tyr Arg Leu Pro Ile Thr Glu Lys Glu Lys Leu Tyr Ala  
 305 310 315 320  
 Gln His Gln Glu Gly Ala Arg Lys Asp Ile Glu Arg Ala Phe Gly Val  
 20 325 330 335  
 Leu Gln Arg Arg Phe Cys Ile Leu Lys Arg Pro Ala Arg Leu Tyr Asp  
 340 345 350  
 Arg Gly Val Leu Arg Asp Val Val Leu Gly Cys Ile Ile Leu His Asn  
 355 360 365  
 25 Met Ile Val Glu Asp Glu Lys Glu Ala Arg Leu Ile Glu Glu Asn Leu  
 370 375 380  
 Asp Leu Asn Glu Pro Ala Ser Ser Ser Thr Val Gln Ala Pro Glu Phe  
 385 390 395 400  
 Ser Pro Asp Gln His Val Pro Leu Glu Arg Ile Leu Glu Lys Asp Thr

405 410 415  
 Ser Met Arg Asp Arg Leu Ala His Arg Arg Leu Lys Asn Asp Leu Val  
 420 425 430  
 Glu His Ile Trp Asn Lys Phe Gly Gly Gly Ala His Ser Ser Gly Asn  
 5 435 440 445  
 Tyr Val Phe Ile Leu His Tyr  
 450 455 460  
 <210> 5  
 <211> 482  
 10 <212> PRT  
 <213> *Oryza sativa*  
 <400> 5  
 Met Gln Ser Leu Ala Ile Ser Leu Leu Leu Ser Glu Thr His Ser Leu  
 1 5 10 15  
 15 Phe Ser His Thr Lys Thr Ser Ser Leu Leu Ser Leu Leu Phe Leu Ser  
 20 25 30  
 Ser Ser Lys Met Ser Glu Gln Asn Thr Asp Gly Ser Gln Val Pro Val  
 35 40 45  
 Asn Leu Leu Asp Glu Phe Leu Ala Glu Asp Glu Ile Ile Asp Asp Leu  
 20 50 55 60  
 Leu Thr Glu Ala Thr Val Val Val Gln Ser Thr Ile Glu Gly Leu Gln  
 65 70 75 80  
 Asn Glu Ala Ser Asp His Arg His His Pro Arg Lys His Ile Lys Arg  
 85 90 95  
 25 Pro Arg Glu Glu Ala His Gln Gln Leu Val Asn Asp Tyr Phe Ser Glu  
 100 105 110  
 Asn Pro Leu Tyr Pro Ser Lys Ile Phe Arg Arg Arg Phe Arg Met Ser  
 115 120 125  
 Arg Pro Leu Phe Leu Arg Ile Val Glu Ala Leu Gly Gln Trp Ser Val

11/17

130                      135                      140  
 Tyr Phe Thr Gln Arg Val Asp Ala Val Asn Arg Lys Gly Leu Ser Pro  
 145                      150                      155                      160  
 Leu Gln Lys Cys Thr Ala Ala Ile Arg Gln Leu Ala Thr Gly Ser Gly  
 5                      165                      170                      175  
 Ala Asp Glu Leu Asp Glu Tyr Leu Lys Ile Gly Glu Thr Thr Ala Met  
 180                      185                      190  
 Glu Ala Met Lys Asn Phe Val Lys Gly Leu Gln Asp Val Phe Gly Glu  
 195                      200                      205  
 10 Arg Tyr Leu Arg Arg Pro Thr Met Glu Asp Thr Glu Arg Leu Leu Gln  
 210                      215                      220  
 Leu Gly Glu Lys Arg Gly Phe Pro Gly Met Phe Gly Ser Ile Asp Cys  
 225                      230                      235                      240  
 Met His Trp His Trp Glu Arg Cys Pro Val Ala Trp Lys Gly Gln Phe  
 15                      245                      250                      255  
 Thr Arg Gly Asp Gln Lys Val Pro Thr Leu Ile Leu Glu Ala Val Ala  
 260                      265                      270  
 Ser His Asp Leu Trp Ile Trp His Ala Phe Phe Gly Ala Ala Gly Ser  
 275                      280                      285  
 20 Asn Asn Asp Ile Asn Val Leu Asn Gln Ser Thr Val Phe Ile Lys Glu  
 290                      295                      300  
 Leu Lys Gly Gln Ala Pro Arg Val Gln Tyr Met Val Asn Gly Asn Gln  
 305                      310                      315                      320  
 Tyr Asn Thr Gly Tyr Phe Leu Ala Asp Gly Ile Tyr Pro Glu Trp Ala  
 25                      325                      330                      335  
 Val Phe Val Lys Ser Ile Arg Leu Pro Asn Thr Glu Lys Glu Lys Leu  
 340                      345                      350  
 Tyr Ala Asp Met Gln Glu Gly Ala Arg Lys Asp Ile Glu Arg Ala Phe  
 355                      360                      365



Gly Val Leu Gln Arg Arg Phe Cys Ile Leu Lys Arg Pro Ala Arg Leu  
 370 375 380  
 Tyr Asp Arg Gly Val Leu Arg Asp Val Val Leu Ala Cys Ile Ile Leu  
 385 390 395 400  
 5 His Asn Met Ile Val Glu Asp Glu Lys Glu Thr Arg Ile Ile Glu Glu  
 405 410 415  
 Asp Leu Asp Leu Asn Val Pro Pro Ser Ser Ser Thr Val Gln Glu Pro  
 420 425 430  
 Glu Phe Ser Pro Glu Gln Asn Thr Pro Phe Asp Arg Val Leu Glu Lys  
 10 435 440 445  
 Asp Ile Ser Ile Arg Asp Arg Ala Ala His Asn Arg Leu Lys Lys Asp  
 450 455 460  
 Leu Val Glu His Ile Trp Asn Lys Phe Gly Gly Ala Ala His Arg Thr  
 465 470 475 480  
 15 Gly Asn  
 485  
 <210> 6  
 <211> 900  
 <212> DNA  
 20 <213> *Oryza sativa*  
 <400> 6  
 tttcaagtac aatctcaact tagggaaagt tgtgattgag ggaggatgtt agataatgtt 60  
 agttagtttg ttatagagat agattagttc tgttaccgca tgtactttct tgtatctatc 120  
 tctatatcca ggattgtctc aggttggtga gattaatcct atcctttgta cagccacgg 180  
 25 tagaggctct ttctgcctat atcaacaaag gtgcggcccc gtaaaggggt tcaacgcttc 240  
 tcattccgtt ttacaatcct ccttcttctt cctggtgttg gaaattcgtt gatcgagttg 300  
 aaactctcat ccttcatcat gtgctgcaga aactaacgcg tgcacagatg atggatgggt 360  
 gtgggtgtgac atgaaagtgg atcaatgaca cgcggcacat ttaggggagt gtgtcgtgtc 420  
 ttgacttctt catgcaaaag tataccaacc ctgtataagg ccagtcacaa tggctagtgt 480

cattgcacgg ctacccaaaa tattatacca tcttctctca aatgaaatct tttatgaaac 540  
aatccccaca gtggaggggt ttcactttga cgtttccaag actaagcaaa gcatttaatt 600  
gatacaagtt gctgggatca tttgtaccca aaatccggcg cggcgcggga gaatgcggag 660  
gtcgcacggc ggaggcggac gcaagagatc cggatgaatga aacgaatcgg cctcaacggg 720  
5 ggtttcactc tgttaccgag gacttggaac cgacgtgac gagtttcacc aggatgaaac 780  
tctttccttc tctctcatcc ccatttcattg caaataatca tttttattc agtcttacc 840  
ctattaaatg tgcatgacac accagtgaac ccccatgtgt gactggccta agcatcttg 900  
<210> 7  
<211> 18  
10 <212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<400> 7  
ttaggccagt cacaatgg 18  
<210> 8  
15 <211> 24  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<400> 8  
gtgcgtggtt ggtctcggtt ttat 24  
20 <210> 9  
<211> 24  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<400> 9  
25 cctccttctt cctcctggtg ttgg 24  
<210> 10  
<211> 28  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<400> 10  
gtaagactga ataaaaaatg attatttg 28  
<210> 11  
<211> 26  
5 <212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<400> 11  
catcttctct caaatgaaat ctttta 26  
<210> 12  
10 <211> 23  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<400> 12  
atgtagtttg tcggtagtt tga 23  
15 <210> 13  
<211> 23  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<400> 13  
20 atgtgttggtg attgatggga taa 23  
<210> 14  
<211> 30  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
25 <400> 14  
gggtgagtga agtgagtgag tgagcagcat 30  
<210> 15  
<211> 30  
<212> DNA

<213> Artificial Sequence  
<400> 15  
agttagggga ggagagttgg gcataggaat 30  
<210> 16  
5 <211> 23  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<400> 16  
gcctcctgct gcgacgtctt cat 23  
10 <210> 17  
<211> 30  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<400> 17  
15 caactggatg agcaagatta cagactaaaa 30  
<210> 18  
<211> 24  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
20 <400> 18  
cagtacgcca ccaatcacca tcat 24  
<210> 19  
<211> 24  
<212> DNA  
25 <213> Artificial Sequence  
<400> 19  
ctcatctcga acgcaacctt aata 24  
<210> 20  
<211> 25

<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<400> 20  
tgtgatgaac agaaccac cgaga 25

5 <210> 21  
<211> 25  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<400> 21

10 cccaaagata cagagcacct acaca 25  
<210> 22  
<211> 21  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

15 <400> 22  
tgatccagat acaacctcca t 21  
<210> 23  
<211> 21  
<212> DNA

20 <213> Artificial Sequence  
<400> 23  
gaaaagaaaa acaacaaga a 21  
<210> 24  
<211> 30

25 <212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<400> 24  
gggtgagtga agtgagtgag tgagcagcat 30  
<210> 25

<211> 30  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<400> 25  
5 agttagggga ggagagttgg gcataggaat 30  
<210> 26  
<211> 21  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
10 <400> 26 21  
cctcacaacc aatccctacc a  
<210> 27  
<211> 21  
<212> DNA  
15 <213> Artificial Sequence  
<400> 27 21  
agccaccaca ataaccaaag t

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP02/11585

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl<sup>7</sup> C12N15/09, 5/14, 9/10, A01H5/00, 5/10

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>7</sup> C12N15/09, 5/14, 9/10, A01H5/00, 5/10

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

GeneBank/EMBL/DDBJ/SwissProt/PIR/GeneSeq,  
CA/BIOSIS/WPIDS/MEDLINE (STN)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages  | Relevant to claim No. |
|-----------|---|-----------------------|
| A         | Chang-Gyun Han et al., "New transposable elements identified as insertions in rice transposon Tnrl", Genes Genet. Syst, 2000, Vol.75, pages 69 to 77, full text   | 1-20                  |
| A         | Thomas E. BUREAU et al., "A computer-based systematic survey reveals the predo, onance of small inverted-repeat elements in wild-type rice genes", Proc.Natl.Acad.Sci. USA, 1996, Vol.93, pages 8524 to 8529, full text | 1-20                  |
| A         | Long Mao et al., "Rice Transposable Elements: A Survey of 73,000 Sequence-Tagged-Connectors", Genome Research, 2000, Vol.10, pages 982 to 990, full text  | 1-20                  |

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.
 ☐ See patent family annex.

|   |  |
|---|--|
| * Special categories of cited documents:  | "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention  |
| "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance  | "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone   |
| "E" earlier document but published on or after the international filing date  | "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art |
| "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) | "&" document member of the same patent family  |
| "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means  |  |
| "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed  |  |

Date of the actual completion of the international search  
04 February, 2003 (04.02.03)Date of mailing of the international search report  
25 February, 2003 (25.02.03)Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP02/11585

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages  | Relevant to claim No. |
|-----------|---|-----------------------|
| A         | WO 96/15252 A1 (Nippon Paper Industries Co., Ltd.),<br>23 May, 1996 (23.05.96),<br>Claims; examples<br>& EP 716147 A1 & JP 9-154580 A<br>& US 5965791 A | 1-20                  |
| A         | WO 01/73036 A1 (National Institute of Agrobiological Sciences),<br>04 October, 2001 (04.10.01),<br>Claims; examples<br>& EP 1275719 A1                  | 1                     |
| T         | Kazuhiro KIKUCHI et al., "The plant MITE mPong is mobilized in anther culture", Nature, 2003, Vol.421, pages 167 to 170, full text                      | 1-20                  |



## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>7</sup> C12N15/09, 5/14, 9/10, A01H5/00, 5/10

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>7</sup> C12N15/09, 5/14, 9/10, A01H5/00, 5/10

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

GeneBank/EMBL/DBJ/SwissProt/PIR/GeneSeq,  
CA/BIOSIS/WPIDS/MEDLINE (STN)

## C. 関連すると認められる文献

| 引用文献の<br>カテゴリー* | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示  | 関連する<br>請求の範囲の番号 |
|-----------------|--|------------------|
| A               | Chang-Gyun Han et al. "New transposable elements identified as insertions in rice transposon Tnrl"<br>Genes Genet. Syst, 2000, Vol. 75, p. 69-77,<br>文献全体参照  | 1-20             |
| A               | Thomas E. BUREAU et al. "A computer-based systematic survey reveals the predo, onance of small inverted-repeat elements in wild-type rice genes"<br>Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1996, Vol. 93, p. 8524-8529,<br>文献全体参照 | 1-20             |
| A               | Long Mao et al. "Rice Transposable Elements: A Survey of 73,000 Sequence-Tagged-Connectors"<br>Genome Research, 2000, Vol. 10, p. 982-990, 文献全体参照  | 1-20             |

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

- 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの  
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの  
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)  
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献  
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

- 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの  
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの  
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの  
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

04.02.03

国際調査報告の発送日

25.02.03

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

坂崎 恵美子



4N

9451

電話番号 03-3581-1101 内線 3488

| C (続き) . 関連すると認められる文献 |  |                  |
|-----------------------|--|------------------|
| 引用文献の<br>カテゴリー*       | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示  | 関連する<br>請求の範囲の番号 |
| A                     | WO 96/15252 A1 (Nippon Paper Industries Co., LTD.) 1996.05.23,<br>特許請求の範囲、実施例等参照,<br>& EP 716147 A1 & JP 9-154580 A & US 5965791 A | 1-20             |
| A                     | WO 01/73036 A1 (独立行政法人農業生物資源研究所) 2001.10.04,<br>特許請求の範囲、実施例等参照,<br>& EP 1275719 A1   | 1                |
| T                     | Kazuhiro Kikuchi et al. "The plant MITE mPong is mobilized in<br>anther culture"<br>Nature, 2003, Vol. 421, p.167-170, 文献全体参照      | 1-20             |